



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Moacir Guimarães de Melo

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, HORMÔNIOS ESTEROIDAIIS E ESTERÓIS
EM CORPOS HÍDRICOS DA CIDADE DE MANAUS**

Manaus-AM
2023

Moacir Guimarães de Melo

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, HORMÔNIOS ESTEROIDAIIS E ESTERÓIS
EM CORPOS HÍDRICOS DA CIDADE DE MANAUS**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Métodos Analíticos e Estudos Ambientais.

Orientadora: Professora Doutora Giovana Anceski Bataglion.

Manaus-AM
2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M528d Melo, Moacir Guimarães de
Determinação de cafeína, hormônios esteroidais e esteróis em corpos hídricos da cidade de Manaus / Moacir Guimarães de Melo .2023
159 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Giovana Anceski Bataglioni
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cafeína. 2. Hormônios esteroidais. 3. Esteróis. 4. Águas superficiais de Manaus. 5. Índice diagnóstico. I. Bataglioni, Giovana Anceski. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MOACIR GUIMARÃES DE MELO

DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, HORMÔNIOS ESTEROIDAIIS E ESTERÓIS EM CORPOS HÍDRICOS DA CIDADE DE MANAUS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Tese aprovada em, 26 de maio de 2023.

Banca examinadora

DOUTOR (A) GIOVANA ANCESKI BATAGLION (PPGQ/UFAM)
PRESIDENTE

DOUTOR (A) CRISTINE MELLO DIAS MACHADO (PPGQ/UFAM)
MEMBRO INTERNO

DOUTOR (A) NEILA DE ALMEIDA BRAGA (PPGQ/UFAM)
MEMBRO INTERNO

DOUTOR (A) MARCO ANTONIO DOS SANTOS FARIAS (UFSCAR)
MEMBRO EXTERNO

DOUTOR (A) JANDYSON MACHADO SANTOS (UFRPE)
MEMBRO EXTERNO

Manaus, 26 de maio de 2023.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de ingressar no programa e contribuir para o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo.

Aos coordenadores do Laboratório de Pesquisa e Ensaio de Combustíveis (LAPEC), pela disponibilidade de laboratórios.

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e aos colaboradores do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), pela disponibilidade de uso do LC-MS/MS para a análise das amostras;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, pela contribuição para minha formação acadêmica;

À profa. Dra. Giovana Anceski Bataglion, pelos ensinamentos transmitidos. Agradeço imensamente pela orientação e compreensão;

Aos amigos de laboratório orientados da profa. Giovana pelo apoio principalmente durante as coletas de amostras e preparo dos extratos, agradeço a amizade e companheirismo;

À toda a minha família, em especial ao meu pai Moizés e à minha avó Carmem. E a minha gratidão mais que especial à minha mãe Edleuza Guimarães (*in memoriam*), meu maior exemplo de perseverança de vida, que presenciou o início dessa jornada, mas não pôde estar fisicamente para ver a conclusão.

RESUMO

A região amazônica é cobiçada mundo a fora, pois, apresenta um grande potencial hídrico, sendo uma região estudada principalmente na área ambiental. No centro dessa região geográfica, encontra-se a cidade de Manaus (capital do Amazonas). Os igarapés (cursos d'água) que cortam a cidade, estão altamente submetidos ao descarte de esgoto doméstico, efluentes industriais e lixo, sendo submetido a uma série de compostos químicos, muitos dos quais considerados como marcadores químicos. A cafeína, os esteróis antropogênicos e os hormônios estão incluídos nessa classe. A cafeína e os hormônios são considerados marcadores químicos urbano. Já os esteróis, podem ser de origem natural ou antropogênica e são considerados como biomarcadores. Neste contexto, este projeto visou a determinação quantitativa através da técnica LC-MS/MS da cafeína, hormônios (estrone, estradiol, estriol, 17 α -etinilestradiol e progesterona) e esteróis (colesterol, epicoprostanol, coprostanol, colestanol, brassicasterol, ergosterol, campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e estigmastanol) em 36 amostras de águas dos igarapés das principais microbacias de Manaus e do Rio Negro, a fim de avaliar a concordância entre diferentes indicadores químicos de poluição antropogênica em corpos aquáticos amazônicos. Este estudo apresenta amostras coletadas em igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke (área preservada), amostras do igarapé Tarumã-Açu (área periurbana), amostras dos igarapés do Quarenta e Mindu (áreas urbanas), e do Rio Negro (área periurbana). A cafeína e os hormônios foram determinados na matéria orgânica dissolvida (MOD) e os esteróis na matéria orgânica particulada (MOP). Os resultados deste trabalho mostram que os igarapés da Reserva Adolpho Ducke e Tarumã-Açu apresentaram semelhanças quanto ao aspecto de maior contribuição de matéria orgânica de origem natural (plantas terrestres e aquáticas) e nas concentrações de marcadores antropogênicos, porém se diferem quanto ao seu aspecto da área de coleta e volume de água. Foi constatado também uma contaminação acentuada por esgoto doméstico não tratado nos igarapés do Mindu e Quarenta, com maiores contribuições de matéria orgânica de origem antrópica, e uma contaminação leve a moderada em áreas de confluência com o do Rio Negro.

ABSTRACT

The Amazon region is coveted worldwide, as it has great water potential, being a region studied mainly in the environmental area. In the center of this geographic region, the city of Manaus (capital of Amazonas) is located. The igarapés (watercourses) that cross the city are highly subject to the disposal of domestic sewage, industrial effluents and garbage, in which a series of chemical compounds are found, many of which are considered chemical markers. Caffeine, anthropogenic sterols and hormones are included in this class. Caffeine and hormones are considered urban chemical markers. Sterols, on the other hand, can be of natural or anthropogenic origin and are considered as biomarkers. In this context, this project aimed at the quantitative determination through the LC-MS/MS technique of caffeine, hormones (estrone, estradiol, estriol, 17 α -ethinyl estradiol and progesterone) and sterols (cholesterol, epicoprostanol, coprostanol, cholestanol, brassicasterol, ergosterol, campesterol, β -sitosterol, stigmasterol and stigmastanol) in 36 water samples from streams of the main watersheds of Manaus and Rio Negro, in order to evaluate the agreement between different chemical indicators of anthropogenic pollution in Amazonian water bodies. This study presents samples collected from streams of the Adolpho Ducke Forest Reserve (preserved area), samples from the Tarumã-Açu stream (peri-urban area), samples from the Quarenta and Mindu streams (urban areas), and the Rio Negro (peri-urban area). Caffeine and hormones were determined in dissolved organic matter (MOD) and sterols in particulate organic matter (MOP). The results of this work show that the creeks of the Adolpho Ducke Reserve and Tarumã-Açu presented similarities regarding the aspect of greater contribution of organic matter of natural origin (terrestrial and aquatic plants) and in the concentrations of anthropogenic markers, however they differ in their aspect of the collection area and volume of water. An accentuated contamination by untreated domestic sewage was also observed in the Mindu and Quarenta streams, with greater contributions of organic matter of anthropic origin, and a light to moderate contamination in areas of confluence with the Rio Negro.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1: Divisão das bacias hidrográficas do Brasil..... | 22 |
| Figura 2: Região da bacia Amazônica e principais cidades..... | 23 |
| Figura 3: Ranking de saneamento básico das capitais brasileiras..... | 26 |
| Figura 4: Divisão Hidrográfica da cidade de Manaus..... | 27 |
| Figura 5: Igarapé urbano de Manaus..... | 30 |
| Figura 6: Estrutura molecular da cafeína..... | 34 |
| Figura 7: Localização das glândulas do Sistema endócrino no corpo humano.. | 40 |
| Figura 8: Estrutura básica de um esteroide..... | 42 |
| Figura 9: Rotas de degradação do colesterol..... | 59 |
| Figura 10: Reação de derivatização do colesterol..... | 61 |
| Figura 11: Esquema básico de uma fonte de APCI..... | 65 |
| Figura 12: Esquema básico de um analisador do tipo quadrupolo..... | 66 |
| Figura 13: Esquema básico de um equipamento de LC-MS/MS..... | 68 |
| Figura 14: Pontos de coleta das amostras de água..... | 71 |
| Figura 15: Etapas do processo de coleta de amostras de água..... | 72 |
| Figura 16: Laboratório de Pesquisa e Ensaio de Combustíveis (LAPEC)..... | 72 |
| Figura 17: Metodologia utilizada para investigar a presença de diferentes indicadores químicos nas frações de MOD e MOP de amostras de águas superficiais..... | 73 |
| Figura 18: Sistema de filtragem de água..... | 73 |
| Figura 19: Filtragem das amostras..... | 74 |
| Figura 20: Extração a partir da MOP retida nos filtros..... | 74 |
| Figura 21: Sistema de SPE acoplado a bomba a vácuo..... | 75 |
| Figura 22: Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, localizado no Instituto de Pesquisa da Amazônia-INPA..... | 75 |
| Figura 22: LC modelo 1200 series acoplado a um espectrômetro de massas modelo API 4000..... | 76 |
| Figura 24: Pontos de amostragem na microbacia dos igarapés do Acará e Tinga, localizado na Reserva Florestal Adolpho Ducke..... | 84 |
| Figura 25: Gráfico de “bolhas” comparando as concentrações de cafeína, hormônios e coprostanol (ng L^{-1}) em todos os corpos aquáticos estudados..... | 114 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|-----|
| Gráfico 1: Disponibilidade de água por habitante no mundo (1000 m ³)..... | 20 |
| Gráfico 2: Comparação das concentrações de coprostanol em fezes de diferentes animais..... | 60 |
| Gráfico 3: As áreas de análises de compostos em relação à polaridade e massa molecular como determinantes da escolha da fonte de ionização..... | 64 |
| Gráfico 4: Proporção relativa de esteróis nas amostras de água coletadas nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke..... | 85 |
| Gráfico 5: Proporção relativa de esteróis nas amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu..... | 90 |
| Gráfico 6: Perfil de distribuição de hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do igarapé do Quarenta..... | 94 |
| Gráfico 7: Proporção relativa de esteróis nas amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta..... | 95 |
| Gráfico 8: Perfil de distribuição de hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do igarapé do Mindu..... | 99 |
| Gráfico 9: Proporção relativa de esteróis das amostras do igarapé do Mindu.. | 100 |
| Gráfico 10: Perfil de distribuição de hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do Rio Negro..... | 104 |
| Gráfico 11: Proporção relativa de esteróis das amostras do Rio Negro..... | 107 |
| Gráfico 12: Teste T ² de Hotelling/Q-residual para todas as amostras deste estudo..... | 110 |
| Gráfico 13: PCA das amostras para dois primeiros componentes principais... | 110 |
| Gráfico 14: Dendrograma HCA da relação de similaridade entre os compostos determinados neste estudo..... | 112 |
| Gráfico 15: Dendrograma HCA da relação de similaridade as amostras deste estudo..... | 113 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Alguns trabalhos publicados relacionados ao pH e a concentração de metais no igarapé do Quarenta..... | 28 |
| Tabela 2: Padrões de qualidade de água de acordo com a resolução 357/05 do CONAMA..... | 29 |
| Tabela 3: Fórmula molecular, massa molecular, origem e estrutura química dos hormônios comumente utilizados em estudos de matrizes ambientais..... | 44 |
| Tabela 4: Propriedades químicas dos hormônios esteroidais..... | 45 |
| Tabela 5: Métodos para a determinação de hormônios esteroidais em amostras de sedimento..... | 47 |
| Tabela 6: Métodos para a determinação de hormônios esteroidais em amostras de água..... | 51 |
| Tabela 7: Fórmula molecular, massa molecular, principais fontes e estrutura química dos esteróis mais comumente utilizados em geoquímica orgânica..... | 57 |
| Tabela 8: Vantagens e desvantagens das técnicas LC-MS/MS, GC-MS e GC-FID, comumente utilizadas para a determinação de esteróis..... | 62 |
| Tabela 9: Transições monitoradas no método SRM para cafeína e hormônios esteroidais..... | 77 |
| Tabela 10: Transições monitoradas no método SRM para os esteróis de interesse..... | 78 |
| Tabela 11: Parâmetros analíticos (LOD, LOQ e recuperação) para os hormônios esteroidais..... | 81 |
| Tabela 12: Parâmetros analíticos (LOD, LOQ e recuperação) para cafeína e esteróis..... | 82 |
| Tabela 13: Concentrações de cafeína (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas em diferentes igarapés da Reserva Adolpho Ducke..... | 83 |
| Tabela 14: Concentrações de esteróis (ng L^{-1}) nas amostras de água coletadas nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke..... | 85 |
| Tabela 15: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke..... | 87 |
| Tabela 16: Concentrações de cafeína (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu..... | 88 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 17: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L ⁻¹) em amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu..... | 89 |
| Tabela 18: Concentrações de esteróis (ng L ⁻¹) nas amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu..... | 90 |
| Tabela 19: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico no igarapé Tarumã-Açu..... | 92 |
| Tabela 20: Concentrações de cafeína em amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta..... | 92 |
| Tabela 21: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L ⁻¹) em amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta..... | 93 |
| Tabela 22: Concentrações de esteróis (µg L ⁻¹) nas amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta..... | 94 |
| Tabela 23: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico no igarapé do Quarenta..... | 96 |
| Tabela 24: Concentrações de cafeína em amostras de água coletadas no igarapé do Mindu..... | 97 |
| Tabela 25: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L ⁻¹) em amostras de água coletadas no igarapé do Mindu..... | 98 |
| Tabela 26: Concentrações de esteróis (µg L ⁻¹) nas amostras de água coletadas no igarapé do Mindu..... | 99 |
| Tabela 27: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico nos igarapés do Mindu..... | 101 |
| Tabela 28: Concentrações de cafeína (ng L ⁻¹) em amostras de água coletadas no Rio Negro..... | 102 |
| Tabela 29: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L ⁻¹) em amostras de água coletadas no Rio Negro..... | 104 |
| Tabela 30: Concentrações de esteróis (ng L ⁻¹) nas amostras de água coletadas no Rio Negro..... | 106 |
| Tabela 31: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico no Rio Negro..... | 109 |
| Tabela 32: Classificação dos corpos aquáticos deste estudo..... | 114 |
| Tabela 33: Comparação das concentrações de cafeína, hormônios (E1, E2, E3 e EE2) e coprostanol em águas superficiais no Brasil..... | 116 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 34: Classificação com base nos índices proposto pela equação proposta neste trabalho..... | 118 |
| Tabela 35: Aplicação do índice diagnóstico proposto para as amostras deste trabalho..... | 119 |
| Tabela 36: Comparação com alguns índices diagnósticos..... | 120 |

SIGLAS E ABREVIações

3 α DIOL: Androstenediol

ADT: Androsterona

ANA: Agência Nacional de Água

ANDRO: Androstenediona

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: Ionização química a pressão atmosférica, do inglês, *Atmospheric-pressure chemical ionization*

APPI: Fotoionização por pressão atmosférica, do inglês, *Atmospheric pressure photoionization*

BPC: Bifenilas policloradas

CNRH: Conselho Nacional de Recursos Hídricos

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPG: Cromatografia de permeação de gel

CT: Cortisol

CTN: Cortisona

Da: Unidade de massa atômica em *Dalton*

DAD: Detector por arranjo de diodos

DCM: Diclorometano

DDD: Diclorodifenildicloroetano

DDE: Diclorodifenildicloroetileno

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DES: Dietilestilbestrol

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHT: Dihidrotestosterona

DXN: Dexametasona

E1: Estrona

E1s: Estrona 3-sulfato

E2: Estradiol

E2S: Estradiol 3-sulfato

E3: Estriol

E3S: Estriol 3-sulfato

EAM: Extração assistida por microondas

EBA: Extração com barra de agitação

EE2: 17 α -etinilestradiol

EEA: Agência Europeia do Ambiente, do inglês, *European Environment Agency*

EI: Ionização eletrônica, do inglês, *Electron ionization*

EHMC: 2-etil-hexil-4-methoxicinamate

ELL: Extração líquido-líquido

ELP: Extração de líquido pressurizado

epiT: Epitestosterona

EQU: Equilin

EQUI: Equilenin

ESI: Ionização electrospray, do inglês *electrospray ionization*

ET: Etiocolanolona

ETE: Estações de Tratamento de Esgoto

EV: 17-bestradiol-17-valerato

eV: Eletro volts

FLD: Detecção por fluorescência, do inglês, *Fluorescence detection*

GC: Cromatografia gasosa, do inglês, *gas chromatography*

HBL: Hidrofílicas Lipofílicas equilibradas Balanced Lipophilic Hydrophilics

HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *High performance liquid chromatography*

HRMS: Espectro de massas de alta resolução, do inglês, *High resolution mass spectrum*

INCTAA: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas

LC: Cromatografia Líquida, do inglês, *liquid chromatography*

LC-MSMS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, inglês *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

LNG: Levonogestrel

ME: Mestranol

MEFS: Micro extração em fase sólida

MegA: Acetato de megestrol

MO: Matéria orgânica

MPA: Medroxyprogesterona

MS: Espectrometria de massas, do inglês, *mass spectrometry*

MTBE: Éter metil terc-butílico, do inglês, *methyl tert-butyl ether*

nd: Não detectado

NE: Nordeste

NET: Northindrona

OC: Octocrileno

OD: Oxigênio dissolvido

OMS: Organização Mundial de Saúde

P: Progesterona

PDN: Prednisolona

PHE: Plano Hidroviário Estratégico

POE: Poluentes orgânicos emergentes

POP: Poluentes orgânicos persistentes

QuEChERS: Extração rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*

s.s: Sedimento seco

SIM: Monitoramento de íon selecionado, do inglês, *Selected ion monitoring*

SMR: Monitoramento de reação selecionada, do inglês, *Selected reaction monitoring*

SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

SPE: Extração em fase sólida, do inglês, *solid phase extraction*

T: Testosterona

TOF-MS: Espectrometria de massas por tempo de voo, do inglês, *Time-of-flight mass spectrometry*

UHPLC: Cromatografia líquida de ultra alta pressão, do inglês, *Ultra-high pressure liquid chromatograph*

UPLC: Cromatografia líquida de ultra desempenho, do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos EUA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

UV: ultravioleta

ZFM: Zona Franca de Manaus

α E2: 17 α -estradiol

β E2: 17 β -estradiol

β E2Ac: Acetato 17 β -estradiol

4MBC: Cânfora 4-metilbenzilideno

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 18 |
| 2. Referencial teórico..... | 20 |
| 2.1. Recurso hídrico amazônico | 20 |
| 2.2. Contaminação dos corpos hídricos de Manaus..... | 24 |
| 2.3. Monitoramento ambiental através de compostos orgânicos..... | 31 |
| 2.4. Contaminantes emergentes | 33 |
| 2.4.1. Cafeína..... | 34 |
| 2.4.1.1. Técnicas analíticas para a determinação de cafeína em matrizes ambientais | 36 |
| 2.4.1.2. Estudos de determinação de cafeína em matrizes ambientais no Brasil .. | 37 |
| 2.4.2. Disruptores endócrinos | 39 |
| 2.4.2.1. Hormônios esteroidais em matrizes ambientais | 41 |
| 2.4.2.2. Técnicas analíticas para a determinação de hormônios esteroidais em matrizes ambientais | 45 |
| 2.4.2.3. Estudos de determinação de hormônios esteroidais em matrizes ambientais no Brasil..... | 54 |
| 2.4.3. Esteróis | 56 |
| 2.4.3.1. Técnicas analíticas para a determinação de esteróis em matrizes ambientais | 61 |
| 2.4.3.2. Estudos de determinação de esteróis em matrizes ambientais no Brasil .. | 63 |
| 2.5. Fundamentos de LC- MS/MS..... | 64 |
| 3. Objetivos | 69 |
| 3.1. Objetivo geral | 69 |
| 3.2. Objetivos específicos | 69 |
| 4. Materiais e métodos | 70 |
| 4.1. Área de estudo | 70 |
| 4.2. Coleta das amostras de água | 71 |
| 4.3. Extração de compostos orgânicos | 72 |
| 4.4. Análise por LC-MS/MS..... | 75 |
| 4.5. Tratamento Estatístico | 79 |
| 4.5.1. Teste T^2 de Hotelling / Q-residual..... | 79 |
| 4.5.2. PCA..... | 80 |
| 4.5.3. HCA | 80 |
| 5. Resultado e discussão..... | 81 |
| 5.1. Parâmetros analíticos..... | 81 |
| 5.2. Determinação dos analitos nas amostras | 82 |

| | |
|--|-----|
| 5.3. Igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke | 82 |
| 5.3.1. Cafeína..... | 82 |
| 5.3.2. Hormônios Esteroidais | 84 |
| 5.3.3. Esteróis | 84 |
| 5.4. Igarapé do Tarumã-Açu | 88 |
| 5.4.1. Cafeína..... | 88 |
| 5.4.2. Hormônios esteroidais | 89 |
| 5.4.3. Esteróis | 89 |
| 5.5. Igarapé do Quarenta | 92 |
| 5.5.1. Cafeína..... | 92 |
| 5.5.2. Hormônios esteroidais | 93 |
| 5.5.3. Esteróis | 94 |
| 5.6. Igarapé do Mindu | 97 |
| 5.6.1. Cafeína..... | 97 |
| 5.6.2. Hormônios esteroidais | 98 |
| 5.6.3. Esteróis | 99 |
| 5.7. Rio Negro..... | 102 |
| 5.7.1. Cafeína..... | 102 |
| 5.7.2. Hormônios esteroidais | 103 |
| 5.7.3. Esteróis | 105 |
| 5.8. Tratamento Estatístico das amostras..... | 109 |
| 5.9. Comparativo entre os corpos hídricos deste estudo..... | 113 |
| 5.9.1. Comparação das concentrações de cafeína, hormônios esteroidais e coprostanol com outros estudos no Brasil | 115 |
| 5.10. Proposta de um novo índice diagnóstico..... | 117 |
| 6. Conclusão | 121 |
| 7. Referências bibliográficas..... | 124 |
| Apêndice A: gráficos estatísticos das amostras..... | 145 |
| Apêndice B: curvas de calibração | 149 |
| Apêndice C: gráfico comparativo das concentrações de esteróis | 154 |
| Apêndice D: percentual de comparação entre cafeína e coprostanol | 157 |
| Apêndice E: área de drenagem dos igarapés da reserva adolpho ducke | 158 |
| Apêndice F: coordenadas geográficas dos pontos de coleta | 159 |

1. Introdução

O monitoramento dos recursos hídricos é uma das principais preocupações em todo mundo, pois os impactos ambientais causados pelas alterações das características naturais de corpos hídricos refletem diretamente não apenas em nos ecossistemas, mas também na saúde pública e em questões socioeconômicas.

Muitos países adotam diretrizes específicas que determinam os limites aceitáveis das características físicas e químicas dos recursos hídricos, seja para águas dulcícolas ou salgadas, potável, de esgoto, subterrâneas etc. No Brasil, o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) é o órgão responsável por estudar e propor diretrizes e políticas governamentais a nível nacional para o meio ambiente e deliberar, sobre normas e padrões incluindo os recursos hídricos. No entanto ainda há necessidade de novos estudos capazes de determinar e estabelecer limites de contaminantes que ainda não estão contemplados em legislação. A necessidade de estabelecer limites de tolerância das características físicas e químicas dos ambientes aquáticos vem do crescente desenvolvimento urbano, numa forma de amenizar os impactos ambientais em corpos hídricos ocasionados a partir da expansão urbana.

Na Amazônia brasileira, existem cidades que ocupam lugar de destaque no crescimento urbano, porém com a falta de planejamento em infraestrutura acabaram levando à expansão populacional desordenada e como consequência a ocupação em moradias próximas ao leito de rios, nascentes e igarapés, gerando a degradação, como é o caso de Manaus-AM.

Parte desses compostos químicos são frequentemente estudados como marcadores químicos. Os marcadores são compostos orgânicos de origem definida, podendo ser natural ou antrópica, com estruturas moleculares quimicamente estáveis, resistência a degradação e a intempéries. São estudadas como indicadores de evento, indicadores de processos que ocorreram no passado ou indicadores de contribuição relativa de matéria orgânica (terrestre, aquática e antrópica).

Nesse contexto, este estudo buscou avaliar a distribuição de cafeína, hormônios esteroidais e esteróis em águas de corpos hídricos da cidade de

Manaus (AM), a fim de avaliar os perfis de distribuição entre diferentes marcadores.

A presença de cafeína no ambiente aquático, é um forte indício de contaminação por esgoto doméstico. Ela está presente em inúmeros produtos do cotidiano, como café e chás, e os resíduos gerados desses produtos caem na rede de esgoto e quando não tratado, vão parar diretamente nos rios. Apesar da cafeína apresentar baixa toxicidade, sua presença pode indicar a presença de outros contaminantes mais tóxicos.

Os hormônios por exemplo, mesmo em baixas concentrações são capazes de afetar o sistema endócrino. Existem estudos que relacionam a presença de hormônios esteroidais e outros contaminantes em ambientes aquáticos com a feminização encontrada em algumas espécies de peixes e a formação de óvulos em animais machos, indicando que mesmo pequenas quantidades, os hormônios que são provenientes de medicamentos, podem ser nocivos ao organismo.

Os esteróis são bastante úteis como biomarcadores geoquímicos na avaliação das fontes de MO biogênica (terrestre e aquática) e antropogênica (esgoto doméstico). Neste sentido, a contaminação de corpos aquáticos pode ser avaliada a partir da determinação de esteróis fecais, como coprostanol e epicoprostanol.

Além de expandir o conhecimento científico sobre os igarapés e rios da região amazônica, os resultados obtidos neste estudo fornecerão informações úteis para acessar os níveis de cafeína, hormônios e esteróis e as fontes desses compostos na região de Manaus, podendo assim, contribuir para futuras pesquisas relacionadas a melhorias dos igarapés através de políticas ambientais capazes de propor a minimização dos níveis de contaminação pelo despejo de esgoto doméstico não tratado. Além disso, há um vasto campo ainda não explorado na avaliação dos níveis de contaminação de águas devido ao aporte de esgoto doméstico, derivados de petróleo e descartes industriais, principalmente em grandes capitais como Manaus.

2. Referencial teórico

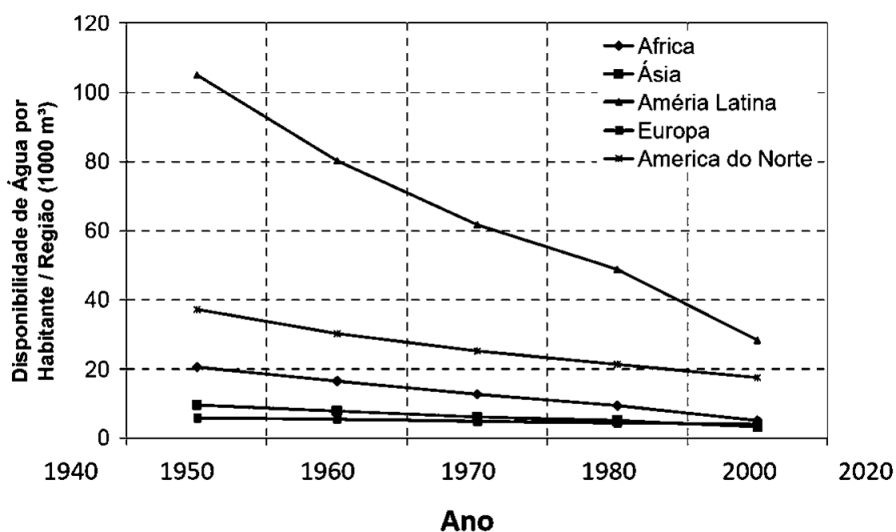
2.1. Recurso hídrico amazônico

Os recursos naturais são quaisquer elementos ou aspectos da natureza que estão à disposição do homem para uso direto ou indireto para atender as suas necessidades, sendo a água e o ar os mais importantes, considerados indispensáveis para os seres humanos (VENTURI, 2006). Apesar de serem considerados renováveis (capacidade de se restabelecerem naturalmente), é essencial o uso sustentável, para que a exploração excessiva não prejudique a capacidade de certos recursos naturais de se reestabelecerem naturalmente (BICUDO; TUNDISI; SCHEUENSTUHL, 2017).

Portanto, é necessário respeitar o tempo de renovação de cada tipo de recurso renovável, de modo que estes continuem disponíveis para satisfazer as necessidades do homem. Caso contrário, os recursos naturais renováveis poderão chegar a ficar indisponíveis futuramente (BICUDO; TUNDISI; SCHEUENSTUHL, 2017).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente, a exploração da água tornou-se uma das maiores problemáticas ambientais. Fato que já é observado ao longo das últimas décadas (gráfico 1), com o aumento populacional e a urbanização desordenada das cidades que contribuem para a elevação dos índices de consumo de água (ANDRADE et al., 2002).

Gráfico 1: Disponibilidade de água por habitante no mundo (1000 m³). Fonte: Adaptado de Andrade et al., 2002.



A água é um recurso fundamental para o desenvolvimento dos seres vegetais e animais e para os seres humanos, a água é essencial não só para suprir as necessidades básicas, mas também para o progresso social e econômico (YASSUDA, 1993; CAI et al., 2016). No Brasil, o recurso hídrico é um dos principais recursos naturais no território nacional, no qual também, localiza-se a maior região hidrográfica do mundo (MORAIS & JORDÃO, 2002). As regiões hidrográficas são bacias, grupo de bacias ou sub-bacias hidrográficas, com características naturais, sociais e econômicas similares, que tem como objetivo orientar o planejamento e gerenciamento dos recursos hídricos em todo o país (TUCCI, 1997). No Brasil, os recursos hídricos têm sua gestão organizada por bacias hidrográficas, seja em corpos hídricos de titularidade da União ou dos Estados (PORTO et al., 2008).

Há certamente dificuldades em se lidar com esse recorte geográfico, uma vez que os recursos hídricos exigem a gestão compartilhada com a administração pública, órgãos de saneamento, instituições ligadas à atividade agrícola, gestão ambiental, entre outros, e cada um desses setores corresponde a uma divisão administrativa certamente distinta da bacia hidrográfica (PORTO et al., 2008). Portanto, a gestão integrada dos recursos hídricos tem como finalidade assegurar sua preservação, uso, recuperação e conservação em condições satisfatórias para os seus múltiplos usuários e de forma compatível com a eficiência e o desenvolvimento equilibrado e sustentável da região (YASSUDA, 1993).

A Resolução n.32 do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), de 15 de outubro de 2003 (BRASIL, 2003), define a divisão hidrográfica nacional em 12 regiões hidrográficas como mostrado na figura 1. Cada região possui suas próprias características naturais, sociais e econômicas.



Figura 1: Divisão das bacias hidrográficas do Brasil. Fonte: Agência Nacional de Águas.

Cerca de um quinto das águas doces correntes do mundo, encontram-se na região amazônica, que abrange o norte da América do Sul estendendo-se por sete países (Brasil, Colômbia, Bolívia, Equador, Guiana, Peru e Venezuela), totalizando uma área de aproximadamente 6 milhões de km², desde os andes peruanos até a foz do Rio Amazonas, no Oceano Atlântico (BRASIL, 2015). Cerca de 63% da bacia amazônica se encontram em território brasileiro, o que traz várias questões transnacionais nas áreas social, econômica, da biodiversidade e ambiental (BICUDO; TUNDISI; SCHEUENSTUHL, 2017).

Essa região concentra 81% da disponibilidade de águas superficiais do Brasil, sendo que cerca de 85% da área da região amazônica permanece com cobertura vegetal nativa (BICUDO; TUNDISI; SCHEUENSTUHL, 2017).

A bacia hidrográfica amazônica é a mais extensa rede hidrográfica do mundo com mais de 15500 km de rios navegáveis de acordo com o Plano Hidroviário Estratégico - PHE (Ministério dos Transportes, 2013). Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA), a bacia amazônica ocupa 45% do território nacional, abrangendo áreas (figura 2) de diferentes estados como: Acre,

Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará e Mato Grosso. Possui uma extensa rede de rios com grande abundância de água, sendo os mais conhecidos: Amazonas, Xingu, Solimões, Madeira e Negro.



Figura 2: Região da bacia Amazônica e principais cidades. Adaptado de Brasil, 2015.

A bacia amazônica compreende a maior floresta tropical do mundo, apresentando cerca de 40% das florestas e 40% de todas as espécies existentes (HANSEN et al., 2013). No entanto, apesar da abundância hidrográfica do território amazônico, seus ecossistemas aquáticos estão cada vez mais em risco devido às alterações hidrológicas, que podem ser ocasionadas por vários fatores, incluindo a expansão da agricultura, construções de represas, desmatamento e a contaminação por resíduos domésticos e industriais (ALHO et al., 2015). Essas alterações hidrológicas podem ocasionar potenciais impactos sociais para a população, pois o recurso hídrico é uma das principais fontes de economia para a região amazônica (BICUDO; TUNDISI; SCHEUENSTUHL, 2017).

2.2. Contaminação dos corpos hídricos de Manaus

O Brasil é um país conhecido por suas riquezas naturais, caracterizado principalmente pela fauna, flora e pela presença abundante de águas dulcícolas, na qual há muitos rios (BICUDO; TUNDISI; SCHEUENSTUHL, 2017).

Na Amazônia, quase todos os rios são resultantes da junção de pequenos e médios cursos d'água chamados de igarapés. Os igarapés caracterizam-se por um longo caminho de rio ou canal que nasce ou corre pelo interior da mata em geral de pouca profundidade, sendo apenas navegável por pequenas e médias embarcações, como canoas e pequenos barcos (VIEIRA; BRITO; TEIXAIRA, 2012). A palavra "Igarapé" é um termo nativo originado da língua indígena, e significa "caminho de canoa" (*ygara*, canoa e *apé*, caminho).

Por correrem no interior das matas, os igarapés estão estreitamente ligados à floresta atuando como corredores ecológicos e área de abrigo ou passagem de diversas espécies de animais e vegetais (BICUDO; TUNDISI; SCHEUENSTUHL, 2017). As alterações ambientais causadas por desmatamento, construção de estradas e poluição antrópica, podem acabar com os igarapés pequenos, especialmente os que se encontram em meio aos centros urbanos (LA ROVERE et al. 2002; VIEIRA; BRITO; TEIXAIRA, 2012).

Em grandes cidades da região norte do Brasil, a contaminação dos igarapés tem crescido a cada ano devido ao aumento da industrialização, constante exploração dos recursos naturais e o crescimento populacional, como é o caso de Manaus (capital do Amazonas) (PINTO et al. 2009).

O município de Manaus está localizado no centro da grande bacia hidrográfica da Amazônia. O município ocupa uma superfície de 11458,5 km² com uma área urbana de apenas 3,9% do município (MARQUES & PINHEIRO, 2011). Manaus fica situada a margem esquerda do Rio Negro (próximo a foz com o Rio Solimões), e é o maior afluente da margem esquerda do Rio Amazonas sendo o sétimo maior rio do mundo em volume de água (BRASIL, 2015).

Durante o apogeu de industrialização, em meados da década de 60, aproveitando a capacidade de autodepuração das águas do Rio Negro, foi instalado um emissário subfluvial para dispersão de efluentes (RIOS, 1982). Um emissário subfluvial é um tipo de tratamento de esgoto onde ele lança o resíduo tratado em corpos hídricos a grandes profundidades, em pontos distantes da

terra firme. Assim como a estação de tratamento de esgoto (ETE) terrestre, ele tem etapas por onde passam os rejeitos, incluindo, grades, caixa de areia, decantador, reator biológico e um segundo decantador. O objetivo é que o esgoto seja transformado para ser auto depurado pela água, tornando-se apenas matéria orgânica para a vida aquática (RIOS, 1982). Porém, os igarapés que passam pelas áreas urbanas de Manaus têm menor eficiência de depuração natural da carga orgânica devido ao seu pequeno porte e como consequência a qualidade da água nesses corpos hídricos fica baixa, prejudicando os seus ecossistemas (BRASIL, 2015; VIEIRA; BRITO; TEIXAIRA, 2012).

Os igarapés são ambientes facilmente contaminados, e assim como em muitas cidades, deságuam diretamente ou indiretamente em grandes rios (PINTO et al., 2009). O problema de contaminação toma proporções cada vez maiores, a medida em que esses rios são captados pelas estações de distribuições de água, o que pode ocasionar potenciais riscos à saúde da população (PINTO et al., 2009).

O crescimento desordenado de Manaus, a partir da implantação do modelo de industrialização da Zona Franca de Manaus (ZFM) em 1967, levou à ocupação urbana de forma irregular ao longo dos igarapés que atravessam a cidade e contribuiu para a contaminação gradual, em grande parte devido ao descarte de esgoto doméstico e industrial. Apesar dos riscos em residir à margem dos igarapés, muitas pessoas não possuem outra escolha a não ser viver nestes locais, propensas a riscos de saúde, devido à vulnerabilidade das moradias precárias em relação aos alagamentos e inundações constantes e, principalmente, devido à falta de saneamento básico (LA ROVERE et al. 2002; NOGUEIRA, 2007; PIO et al., 2013; SANTANA, 2015).

Tal problema, não se restringe apenas a capital de Manaus, segundo os dados do Instituto Trata Brasil (2022), a região norte do país é a que apresenta as maiores deficiências no saneamento básico com baixas coberturas de coleta e tratamento de esgotos domésticos, no abastecimento de água e na destinação de resíduos sólidos (figura 3).

Na região Norte, 13,1% da população tem acesso à coleta de esgoto e apenas 21,4% do esgoto doméstico coletado é tratado. De acordo com dados do Instituto Trata Brasil (2022), a média brasileira é de 55% de coleta de esgoto, e desse percentual, 50,8% é tratado. Ainda segundo o Instituto Trata Brasil,

existem capitais na região norte com indicadores de tratamento de esgoto bem inferiores à média nacional, como é o caso de Manaus-AM, onde apenas 24,14% de esgoto é tratado.



Figura 3: Ranking das posições de saneamento básico das capitais brasileiras, levantado pelo instituto Trata Brasil em 2022. Das 100 maiores cidades monitoradas pelo instituto, a maioria das capitais do Norte estão entre as piores no ranking.

A região de Manaus é entrecortada por uma densa rede hidrográfica composta por nove microbacias (figura 4). Dentre estas, destacam-se cinco: Puraquequara que está inserida em área de floresta, Tarumã que está parcialmente inserida em área urbana e as microbacias do Educandos, Mindu e Colônia Antônio Aleixo, as quais estão inseridas totalmente em área urbana (LA ROVERE, 2002; ALBUQUERQUE, 2012).

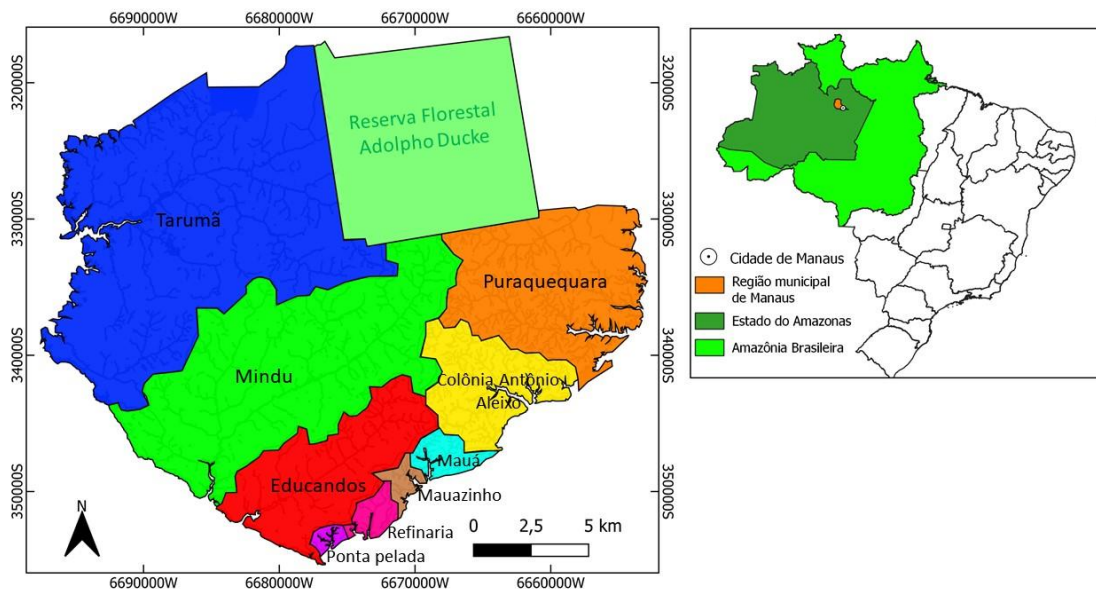


Figura 4: Divisão Hidrográfica da cidade de Manaus constituída pelas microbacias: Colônia Antônio Aleixo, Educandos, Mauzinho, Mauá, Mindu, Ponta Negra, Puraquequara, Refinaria e Tarumã. Outras pequenas bacias configuram-se como vias fluviais com regime de cheias e vazantes condicionado pelo Rio Negro, rio que banha a cidade. Adaptado de Albuquerque, 2012.

Os igarapés que cortam a área urbana de Manaus estão praticamente todos contaminados. São observados vários efeitos decorrentes da contaminação por esgoto doméstico e industrial, como a presença de contaminantes orgânicos emergentes, o aumento do pH da água, diminuição do oxigênio dissolvido (OD) e altos teores de metais, como Zn, Co, Cu, Fe, Ni, Mn, Cr e Cd, e conseqüentemente a presença de espécies de peixes com altas concentrações de metais presentes em seus organismos (PINTO et al., 2009; PIO et al., 2013; SANTANA, 2015; SANTANA, 2016).

Estima-se que 80% da malha de igarapés que cobre a cidade de Manaus está contaminada (SANTANA, 2015). A microbacia do Mindu é a maior inserida na malha urbana, tendo o igarapé do Mindu como principal tributário (SANTOS & ALVES 2013). O Mindu é o igarapé mais extenso na área urbana de Manaus. A região da microbacia deste igarapé ocupa aproximadamente 1/4 do território urbano (BORGES & SANTOS, 2011). Ao cruzar inúmeros bairros, desde sua nascente na zona norte passando pela zona leste até a zona oeste da cidade, o igarapé do Mindu recebe grande quantidade de esgoto não tratado oriundos de resíduos domiciliares, constatados pelas altas concentrações de esterol fecal

(coprostanol; 523-6113 ng g⁻¹) encontrados em vários pontos deste igarapé (MELO et al., 2019).

Outros igarapés contribuintes da microbacia do Mindu também estão em condições degradáveis, como por exemplo o igarapé do Bindá, que, segundo Santos e Alves (2013), encontra-se degradado devido ao lançamento *in natura* de esgoto doméstico ao longo do igarapé, sendo que, os resíduos sólidos, também estão presentes na paisagem, embora exista o serviço de coleta de lixo periódico, o ambiente encontra-se nessas condições.

A microbacia do Educandos é a segunda maior da malha urbana, e passa por bairros densamente povoados, sendo o Quarenta o seu principal igarapé. O igarapé do Quarenta é o segundo maior igarapé da área urbana de Manaus, atravessando bairros populosos da cidade, como Educandos, Raiz e Crespo, além também da área industrial de Manaus (MACHADO, ZANETI E HIGUCHI, 2019). E nele constitui emissões de efluentes industriais e domiciliares (PINTO et al., 2009; RODRIGUES, SANTOS e SANTOS 2009; MELO et al., 2019). Os altos níveis de esterol fecal encontrados nas amostras de sedimento do igarapé do Quarenta (509 a 12830 ng g⁻¹) apontam para uma grande contaminação por esgoto não tratado (MELO et al., 2019). Além da presença de poluentes orgânicos, os metais tóxicos presentes no igarapé do Quarenta também foram estudados. Na tabela 1, estão listados alguns valores máximos de metais encontrados em trabalhos realizados no igarapé do Quarenta tanto em água quanto sedimento em estudos publicados desde a década de 80.

Tabela 1: Alguns trabalhos publicados relacionados ao pH e a concentração de metais no igarapé do Quarenta. Adaptado de TORREZANI, 2016.

| Amostras | pH | Cu | Zn | Cd | Cr | Ni | Fe | Autores |
|-------------|-----|-------|--------|------|-------|-------|------|--------------------|
| Água * | 5,5 | - | 0,19 | - | - | - | 1,4 | Bringel (1986) |
| Sedimento** | 6,1 | 1524 | 1048 | 11 | 274 | 491 | 40 | Valle (1998) |
| Água * | 5,8 | 1,2 | 19,6 | nd | 0,7 | - | 29 | Sampaio (2000) |
| Sedimento** | 5,9 | 1,2 | 2,3 | nd | - | - | 114 | Sampaio (2000) |
| Água* | 6,9 | 0,3 | 27,6 | nd | 0,2 | 9,4 | 9 | Dias (2001) |
| Água* | - | 67,8 | 406,1 | nd | 10,5 | 1468 | 187 | Guedes (2003) |
| Sedimento** | 6,5 | 0,04 | 4,85 | - | 0,57 | 5,14 | 20,9 | Oliveira (2002) |
| Sedimento** | - | 44,86 | 174,86 | 1,95 | 37,54 | 29,26 | - | Melo et al. (2020) |

* mg L⁻¹; ** mg g⁻¹; nd não detectado.

Analisando os valores encontrado na tabela 1, notamos que todos os metais apresentados na tabela estão acima dos limites estabelecidos pela

resolução 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para as amostras de água. O CONAMA, órgão responsável por estabelecer normas e padrões ambientais no Brasil, não especifica os limites de metais determinados em sedimentos de águas doce em suas resoluções.

Tabela 2: Padrões de qualidade de água de acordo com a resolução 357/05 do CONAMA. Adaptada de Brasil 2005.

| Parâmetros | Valor limites |
|------------|---------------|
| pH | 6,0-9,0 |
| Cu | 0,009* |
| Zn | 0,18* |
| Cd | 0,01* |
| Cr | 0,05* |
| Ni | 0,025* |
| Fe | 0,3* |

* mg L⁻¹.

A microbacia do Tarumã localizada na zona Oeste de Manaus ainda mantém aspectos naturais preservados, como áreas de vegetação nativa. Mas, as atividades econômicas se ampliam na medida em que a área urbana da cidade se expande. Seus tributários, como o igarapé Acará, cujas nascentes se encontram em área de proteção na Reserva Florestal Adolpho Ducke, ainda estão preservadas, mas grande parte dos demais tributários, entre eles os igarapés Bolívia e Matrinxã, se encontram em processo de degradação causada pelo aterro controlado da cidade, segundo estudos de Santos, Horbe e Silva (2006). Já o igarapé Tarumã-Açu, localizado na extremidade do perímetro urbano, compõe um dos maiores tributários do Rio Negro na região da cidade. Segundo Melo et al. (2019), o igarapé Tarumã-Açu apresenta uma entrada leve a moderada de esgoto doméstico nessa região, corroborada pela variação de coprostanol (<LOD-142 ng g⁻¹), sendo que a maioria das amostras apresentaram concentrações variando de 5 a 19 ng g⁻¹ (valores acima de 100 ng g⁻¹ são considerados indicativos de contaminação por esgoto doméstico). Esses resultados corroboram que o igarapé do Tarumã-Açu está sujeito a um leve a moderado aporte de esgoto doméstico.

De modo geral, os igarapés inseridos na malha urbana, manifestam-se em vários níveis de degradação ambiental produzidos principalmente pelo adensamento populacional, pela ausência de uma infraestrutura urbana e de

políticas públicas que possam impedir o lançamento de efluentes e melhore o sistema de rede de esgoto na cidade. A figura 5 mostra a situação de alguns igarapés que estão inseridos na área urbana.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5: Os igarapés urbanos de Manaus possuem moradias ao longo de sua extensão na qual é observado despejo esgoto direto nos afluentes. O mau cheiro e a grande quantidade de lixo, também são característicos na maioria desses igarapés.

Caso não se reverta esse quadro, os níveis de degradação ambiental tenderão a aumentar, contaminando cada vez mais os igarapés, lençol freático e solo, conseqüentemente prejudicando a saúde da população.

Podemos destacar também os estudos realizados em amostras do Rio Negro, que mostraram a presença de poluentes orgânicos emergentes como o diclofenaco, comparáveis aos encontrados nos rios europeus que recebem águas de esgoto tratadas e que indica a incapacidade das estações de tratamento convencionais em remover estes compostos (THOMAS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

De acordo com Thomas et al 2014, além do diclofenaco, também foram constatadas a presença de amitriptilina, carbamazepina, citalopram, metaprolol e sertralina nas águas do Rio Negro, em concentrações que variaram de 0,02 a 0,62 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A presença de poluentes orgânicos emergentes em água do Rio Negro confirma a ausência de tecnologias avançadas para remoção de contaminantes orgânicos no tratamento de esgoto, que é a consequência da falta de políticas públicas de regulamentação rígidas por parte do Ministério da Saúde.

2.3. Monitoramento ambiental através de compostos orgânicos

O crescimento populacional e industrial durante o século XX levaram ao aumento da produção de inúmeros compostos químicos que são consumidos em larga escala para as mais variadas aplicações e eliminados continuamente por milhões de pessoas no mundo inteiro (STARLING et al., 2018). No entanto, uma das desvantagens da produção e utilização destes compostos químicos está nos resíduos que são gerados, que podem impactar de forma negativa na saúde e no meio ambiente (STARLING et al., 2018).

Através das agências ambientais regulatórias, vários países buscam estabelecer procedimentos de caracterização e controle de substâncias prejudiciais ao meio ambiente. Dentre essas substâncias estão os contaminantes orgânicos, encontrado em baixas concentrações, que estão sendo estudados desde os anos 70 em matrizes ambientais (SALDANHA et al., 2010).

A Comissão Europeia sobre Meio Ambiente (*European Commission for Environment*) designa 33 substâncias ou grupos de substâncias orgânicas que estão na lista de contaminantes prioritárias para as quais foram estabelecidos padrões de qualidade ambiental. Similarmente a Agência de Proteção Ambiental dos E.U.A. (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) apresenta uma lista com 129 compostos prioritários, sendo 12 deles classificados como as mais tóxicas substâncias conhecidas.

No Brasil, a resolução do CONAMA 357/05, estabelece os limites de substâncias químicas em corpos aquáticos, bem como as diretrizes ambientais para sua classificação. Esta resolução inclui 54 compostos orgânicos e 33 espécies inorgânicas.

Já a resolução 375/06 do CONAMA, foi fundamentada em resultados de pesquisas nacionais e em legislações internacionais. A resolução 375/06 estabelece 34 substâncias consideradas contaminantes orgânicos em esgoto, dentre compostos industriais e agrotóxicos e que inclui 12 compostos estabelecidos na Convenção de Estocolmo (2001), cuja produção e uso estão proibidos no Brasil desde 2004 (BRASIL, 2006).

Sabe-se que a maior parte desses contaminantes tem como destino os corpos hídricos, seja por ação da chuva ou principalmente pelo lançamento de

esgoto (BITTENCOURT et al. 2016; STARLING et al., 2018). Como o consumo de água pelos seres humanos também ajuda no funcionamento do organismo, após a água ser usada ou ingerida pelas pessoas, caem no sistema de esgoto, que em muitos casos, não passam pelo sistema de tratamento, levando consigo uma infinidade de moléculas contaminantes para os corpos hídricos que são canalizados até o rio principal (SILVA& COLLINS, 2011).

No Brasil, alguns compostos que não estão incluídos em resoluções do CONAMA, estão sendo estudados, devido aos níveis crescentes de utilização e ao potencial risco à saúde e ao ambiente, pois, temos uma variedade de classes de compostos que são inseridos diariamente no ecossistema, uma vez que no Brasil a pesquisa sobre o tema ainda é escassa (BITTENCOURT et al. 2016; STARLING et al., 2018).

Os estudos das classes de compostos orgânicos utilizados como marcadores geoquímicos, podem utilizar-se dessa classe a fim de monitorar os níveis de contaminação de corpos aquáticos ou de contribuição de matéria orgânica (CARREIRA et al., 2011; SOJINU et al.,2012; MARTIN et al., 2012; FRENA et al., 2016). Os marcadores geoquímicos, são compostos que apresentam uma origem conhecida, podendo ser natural ou antrópica, são quimicamente estáveis e frequentemente utilizados em monitoramentos ambientais (MELO et al., 2019). O destino dos marcadores geoquímicos nos corpos hídricos depende de suas propriedades físico-químicas e sua interação com a matriz ambiental, podendo estar suspensos na coluna d'água ou associados aos materiais particulados. Uma vez que um marcador geoquímico ou seu metabólito ou produto de sua transformação chega ao ambiente aquático, ele pode sofrer vários fenômenos como adsorção, absorção, diluição, hidrólise, fotólise, biodegradação, volatilização, oxidação ou complexação. Cada um desses fenômenos leva à degradação, transformação ou persistência do composto no ambiente (STARLING et al., 2018).

Graças aos avanços de técnicas instrumentais de química analítica, a determinação e quantificação de marcadores geoquímicos tornou-se cada vez mais expressiva, permitindo a detecção desses compostos a níveis cada vez mais baixos (nanogramas e microgramas) em compartimentos ambientais tais como solo, águas superficiais, águas subterrâneas e sedimentos (MATIC et al., 2014).

Os marcadores geoquímicos se apresentam nas mais variadas classes de compostos. As classes dos contaminantes emergentes e os esteróis foram selecionadas para este estudo. Dentre os compostos incluídos como contaminantes emergentes estão a cafeína e os hormônios esteroidais, que serão objetos deste estudo e que podem ser determinadas a partir da matriz orgânica dissolvida ou suspensa particulada (GARDINALI & ZHAO, 2002; FENT, 2015; MELO et al., 2019). Já a classe dos esteróis, pode ser dividido em esteróis naturais e antropogênicos e são comumente determinados na matriz sedimentar, porém também uma fração destes compostos podem ser determinados na matriz orgânica suspensa particulada (COSTA; PESSOA; CARREIRA, 2018; MELO et al., 2019; ARAÚJO et al., 2021).

2.4. Contaminantes emergentes

Os contaminantes emergentes, referem-se a qualquer composto químico presente numa variedade de produtos ou ainda qualquer micro-organismo, que podem ser encontrados em matrizes ambientais e biológicas, que não são usualmente monitorados ou que ainda não possuem legislação regulatória correspondente, mas que apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente (SILVA& COLLINS, 2011; STARLING et al., 2018). Os contaminantes emergentes não necessitam persistir no meio ambiente para causar efeitos negativos, visto que suas altas taxas de transformação e remoção são compensadas pelas suas contínuas introduções no meio ambiente (SILVA& COLLINS, 2011; STARLING et al., 2018).

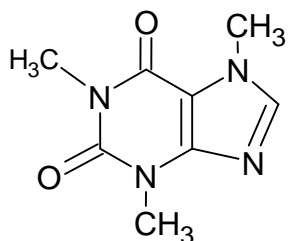
Dentro da classe de contaminantes emergentes, podemos destacar são os produtos farmacêuticos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 50% de todos os medicamentos são prescritos de forma incorreta, além do mais, cerca de 50% dos pacientes usam os medicamentos de forma incorreta. A situação é pior em países em desenvolvimento, com menos de 40% dos pacientes do setor público e menos de 30% no privado sendo tratados de acordo com as diretrizes clínicas (BRASIL, 2012). Durante as últimas décadas, o aumento significativo do consumo e do uso indiscriminado de medicamentos vem sendo motivo de discussões, pois boa parte desses medicamentos tem como destino o meio ambiente, incluindo os ecossistemas aquáticos (LIU & WONG, 2013). Dentre as principais fontes de produtos farmacêuticos presentes

em ambientes aquáticos estão os processos de eliminação animal e humano, efluente da indústria farmacêutica, os resíduos hospitalares e descarte inadequado dos medicamentos vencidos e/ou não utilizados. Os fármacos são intensamente consumidos nas regiões desenvolvidas do mundo, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, países esses que possuem legislações bem definidas em sua literatura por seus órgãos governamentais responsáveis e muitos desses fármacos possuem potencial de bioacumulação e ainda podem apresentar um potencial de toxicidade (LIU & WONG, 2013; STARLING et al., 2018).

2.4.1. Cafeína

A cafeína (figura 6) é um composto químico classificado como alcaloide do grupo das xantinas. No grupo das xantinas, a cafeína é a molécula que mais atua sobre o sistema nervoso central. Ela atua ainda sobre o metabolismo e aumenta a produção de suco gástrico (CARVALHO et al., 2022). No seu uso comercial, é empregada em medicamentos, moderadores de apetite, estimulantes físicos, chá, refrigerantes, chocolates e café (GONÇALVES, RODRIGUES e SILVA-FILHO 2017).

A cafeína é encontrada em cerca de 60 espécies de plantas e sua função no organismo vegetal é atuar como uma espécie de pesticida natural, agindo como paralisante e até matando de insetos que tentam se alimentar da planta (NATHANSON, 1984; CARVALHO et al., 2022). As principais plantas que contém cafeína são: as folhas da erva-mate, sementes do café, frutos do cacau, frutos do guaraná e nas folhas da coca.



Fórmula molecular
 $C_8H_{10}N_4O_2$
 Nome oficial (IUPAC)
 1,2,7-trimetilxantina
 Número CAS
 59-08-2

Figura 6: Estrutura molecular da cafeína.

A cafeína é uma droga que pode causar dependência química. Sua dose letal é cerca de 10 g para administração oral para um adulto, o que corresponde a 100 xícaras de café, 200 latas de refrigerante de cola e 50 kg de chocolate. A

cafeína também causa malefícios para o organismo e sintomas desagradáveis, tais como irritabilidade, insônia, taquicardia e vasodilatação periférica, diarreia e efeito diurético (MARASCO JR; LUCHIARI; GOMES 2019).

O consumo médio global de cafeína por dia é aproximadamente 70,0 mg por pessoa. Contudo, países como Suíça, Reino Unido e os Estados Unidos da América têm esta média de consumo por pessoa estimado em 300 mg, 440 mg e 210 mg, respectivamente. Estima-se que grande parte da população adulta brasileira consome a dose diária igual ou superior a 300 mg de cafeína (MARASCO JR; LUCHIARI; GOMES 2019).

O amplo uso dessa substância levanta uma questão importante sobre seu destino. Por apresentar uma alta solubilidade em água ($13,4 \text{ g L}^{-1}$) e baixa volatilidade, é facilmente detectada nos efluentes das grandes cidades. As concentrações de cafeína encontradas em corpos hídricos não fazem necessariamente mal à saúde com seu contato direto em seres humanos, porém, sua presença na água sinaliza a existência de outros contaminantes advindas da entrada de esgoto não tratado (GLASSMEYER et al., 2005; IDE et al., 2013)

Em ambientes naturais, a cafeína tem um tempo de meia-vida de 30 dias, permitindo sua mensuração em amostras ambientais mesmo algum tempo após a contaminação inicial. Por esse motivo, a detecção de cafeína também pode indicar uma entrada recente de esgoto doméstico (GONÇALVES; RODRIGUES; SILVA-FILHO 2017).

Aproximadamente 3% da cafeína é excretada do corpo humano de forma inalterada por meio da urina (LELO et al., 1986), entretanto alimentos e bebidas que não são consumidos podem ser lançados junto a efluentes líquidos, os quais constituem em uma importante fonte desta substância nos esgotos (IDE et al., 2013).

A determinação da concentração da cafeína pode ser empregada como indicador de entrada de esgoto não tratado, com maior eficiência que análises microbiológicas (coliformes, por exemplo), devido a sua natureza antrópica, sua estabilidade e relativa resistência a degradação (KNEE et al., 2010; MELO et al., 2023).

Por ser uma substância estável no ambiente e não apresenta outras fontes significativas além da humana, faz com que a torne um ótimo marcador geoquímico de atividade antrópica (GARDINALI & ZHAO, 2002).

2.4.1.1. Técnicas analíticas para a determinação de cafeína em matrizes ambientais

Por apresenta baixa volatilidade e alta polaridade, a cafeína é ideal para ser analisada por cromatografia líquida, por isso, é o método mais empregado para sua determinação em matrizes ambientais devido as características moleculares do composto (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; GLASSMEYER et al., 2005; IDE et al., 2013; MELO et al., 2023).

Uma das vantagens da cromatografia líquida é a variedade de detectores acoplados que podem ser utilizados para a detecção de compostos. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS do inglês *Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry*) permite a multianálise de compostos não voláteis com estruturas químicas diferentes, sem a necessidade de derivatização dos analitos. Um segundo ponto relevante desta técnica é permitir o uso de métodos mais simples para pré-tratamento da amostra, sendo possível, em alguns casos, a eliminação completa de qualquer método de extração dos analitos. Desta forma, o método é rápido e fornece uma identificação inequívoca da cafeína, com alta precisão, exatidão e sensibilidade (DE MARIA & MOREIRA 2007).

Embora a cromatografia gasosa (GC do inglês *Gas Chromatography*) tenha alta precisão e sensibilidade, o número de trabalhos científicos que aborda a análise de cafeína pela GC é muito baixo. A fração não volátil do extrato contendo a cafeína apresenta uma variedade de moléculas, com isso a análise torna-se complexa, já que a presença desses compostos nos sistemas de injeção e separação do GC provoca interferências sérias na análise (THOMAS & FOSTER 2004). Além do mais, a cafeína necessita de um passo prévio de derivatização para aumentar a sua volatilidade e facilitar a análise por GC. Certamente a derivatização é o fator determinante para o menor uso desta técnica na análise de cafeína que geralmente é acoplada em um detector de espectrometria de massas, GC-MS (do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) (DE MARIA & MOREIRA 2007).

Uma alternativa para análise de cafeína que vem sendo estudada nos últimos anos é o uso da cromatografia de troca iônica. Entretanto, o método consome muito tempo e as condições cromatográficas podem variar

consideravelmente, em função da composição química das matrizes a serem analisadas (DE MARIA & MOREIRA 2007).

Já o uso HPLC-UV (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de ultravioleta, do inglês *High Performance Liquid Chromatography- Ultraviolet*) para determinação de cafeína foi um salto qualitativo importante no que diz respeito aos parâmetros de precisão, exatidão e rapidez na análise. Também permitiu pela primeira vez a multianálise de metilxantinas, como cafeína, teofilina (1,3-dimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) (DE MARIA & MOREIRA 2007). Com o desenvolvimento da HPLC-UV/DAD (Detector de Arranjo de Diodos- DAD, do inglês *Diode Array Detector*) a multianálise de metilxantinas melhorou em termos de precisão e exatidão, já que cada alcalóide foi analisado no seu comprimento de onda máximo de absorção (IDE et al., 2013).

A principal limitação da HPLC-UV é a necessidade de uma preparação extensiva da amostra (KHALIK et al., 2020). Esta estratégia é essencial para se eliminar interferentes nas matrizes, particularmente nos fluídos biológicos, que coeluem com a cafeína e, também, absorvem na mesma faixa de comprimento de onda (PETEFFI et al., 2018; MIZUKAWA et al., 2019).

2.4.1.2. Estudos de determinação de cafeína em matrizes ambientais no Brasil

Nos últimos anos, a determinação de cafeína no Brasil vem sendo cada vez mais estudada não só como marcador isolado indicativo de contaminação, mais também associada a outros objetos de estudos como forma complementar de avaliação do ecossistema local (CARVALHO et al., 2022). Porém, o Brasil ainda não possui uma legislação de monitoramento dos limites a cafeína em corpos hídricos. Os trabalhos encontrados em literaturas, mostram que, detecção de concentrações de cafeína relativamente altas, apresentam fortes indícios de contaminação por esgoto não tratado.

Em um estudo publicado por Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho (2017), as concentrações de cafeína foram determinadas em amostras coletadas no Rio Paquequer, dentro da área urbana de Teresópolis (RJ). Nesse estudo, as concentrações de cafeína foram encontradas numa faixa de 0,16 mg L⁻¹ a 47,5 mg L⁻¹. Os resultados mostraram uma relação positiva entre as concentrações de cafeína, fosfato, nitrato e amônia devido a entrada de esgoto.

Em um outro estudo levantado por Peteffi et al. (2018), na bacia hidrográfica do Rio dos Sinos (RS), mostrou uma concentração total de cafeína variando de 41,67 ng mL⁻¹ a 6195,38 ng mL⁻¹, sendo que os níveis de cafeína foram associados como indicativo da presença do vírus *Human mastadenovirus* e coliformes. As amostras foram coletadas na área urbana e periférica da cidade de Novo Hamburgo.

No Lago Paranoá (DF) (reservatório urbano de captação de água de Brasília), a cafeína foi o contaminante mais abundante (encontrado com concentração média de 53 ng L⁻¹), seguida do atenolol (34 ng L⁻¹), N, N - dietil- meta-toluamida (12 ng L⁻¹) e atrazina (3,8 ng L⁻¹). As concentrações mais elevadas foram detectadas durante a estação seca. Enquanto que nas águas nascentes que formam esse lago, as concentrações foram menores em comparação com as águas do Lago Paranoá. Nesse trabalho também foi analisada água potável e apenas a cafeína e a atrazina foram detectadas nas concentrações médias de 8,6 ng L⁻¹ e 3,2 ng L⁻¹, respectivamente (SODRÉ et al., 2018).

Para analisar a possibilidade do uso da cafeína como parâmetro de qualidade da água da bacia hidrográfica do Iguaçu em Curitiba-PR, Mizukawa et al. (2019), monitorou três rios dessa região (Atuba, Belém e Palmital). Os resultados indicaram que a área de estudo apresenta grande influência antrópica, provavelmente pela falta de infraestrutura, que indica a presença de efluentes domésticos não tratados. As concentrações de cafeína variaram de 0,07 µg L⁻¹ a 23,08 µg L⁻¹, sendo o Rio Belém o mais poluído. Ainda na região da bacia hidrográfica do Iguaçu, IDE et al. (2017), verificou a ocorrência de vários contaminantes emergentes dentre eles a cafeína, que variou de 0,07 µg L⁻¹ - 59,81 µg L⁻¹, valor esse próximo aos encontrados nos estudos de Mizukawa et al. (2019).

Um trabalho publicado recentemente por Rico et al. (2021) determinou-se a concentração de uma série de contaminantes emergentes, dentre eles a cafeína, em vários rios e igarapés das principais cidades da região amazônica. No Rio Negro (próximo a Manaus-AM), a concentração de cafeína variou de 15 ng L⁻¹ a 45 ng L⁻¹. Já as amostras coletadas dentro da cidade de Manaus variaram de 7033 ng L⁻¹ a 12237 ng L⁻¹. Nas amostras do Rio Amazonas (AM), a concentração de cafeína variou de 14 ng L⁻¹ a 61 ng L⁻¹. Ainda no Rio

Amazonas, porém estado do Pará, a concentração de cafeína variou de 49 ng L⁻¹ a 573 ng L⁻¹. As amostras do Rio Tapajós (PA) variaram de 158 ng L⁻¹ a 153 ng L⁻¹ e na cidade de Santarém -PA, as concentrações variaram de 185 ng L⁻¹ a 3289 ng L⁻¹. Nas amostras coletadas dentro da cidade de Macapá (AP), a concentração de cafeína variou de 2004 ng L⁻¹-7249 ng L⁻¹. Já as concentrações das amostras coletadas no Rio Tocantins (próximo a cidade de Belém-PA) variaram de 61 ng L⁻¹- 133 ng L⁻¹. E por fim as de cafeína das amostras coletadas dentro da cidade de Belém variaram de 284 ng L⁻¹- 10265 ng L⁻¹.

2.4.2. Disruptores endócrinos

Os contaminantes emergentes que são capazes de interferir no sistema endócrino de organismos vivos são chamados de disruptores endócrinos, e sua presença em ambientes aquáticos está na maioria das vezes associada ao uso produtos farmacêuticos. Os disruptores endócrinos são substâncias químicas que, mesmo presente em concentração extremamente baixa, são capazes de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino (GHISELLI & JARDIM, 2007; FENT; ZENKER; RAPP, 2010; LI et al., 2016).

Os primeiros estudos sobre disruptores endócrinos surgiram em meados da década de 80 com a observação de características femininas em aves machos devido à exposição ao pesticida DDT na região dos Grandes Lagos (América do Norte), sendo o mesmo fenômeno encontrado em populações de jacarés em um lago no estado da Flórida (EUA). Na Europa, por volta da mesma época, pescadores britânicos relataram a ocorrência de características sexuais de hermafroditismo em peixes da espécie *Rutilus rutilus* que habitavam uma lagoa onde havia um ponto de despejo de efluentes de uma estação de tratamento de esgoto (REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007).

Com o avanço da tecnologia na área da ecotoxicologia ambiental, constatou-se que certas classes de contaminantes eram capazes de interferir no sistema endócrino do organismo causando efeitos adversos nos seres vivos como: alteração dos genes, interferência na reprodução, alteração do sistema neurológico e imunitário, dentre outros efeitos adversos ligados ao sistema endócrino (STARLING et al., 2018).

Muitas substâncias químicas têm demonstrado potencial para serem classificadas como disruptores endócrinos. A de origem antrópica que podem

ser denominadas como xenoestrogênios e os de ou de origem natural são denominados de fitoestrogênios (GHISELLI & JARDIM, 2007).

Os disruptores endócrinos podem ser substâncias orgânicas ou inorgânicas atuando no organismo substituindo os hormônios, bloqueando a sua ação natural, ou ainda, elevando ou reduzindo a quantidade original de hormônios e levando a alteração do funcionamento do sistema endócrino (WEE & ARIS, 2017).

Para o funcionamento do corpo humano, o organismo conta com uma série de sistemas que são de vital importância, dentre eles está o sistema endócrino. Cada órgão que compõe este sistema apresenta uma característica fundamental, que é segregar um certo tipo de hormônio e cada hormônio tem suas funções, que são principalmente regulação do funcionamento de outros órgãos, que estão relacionados (DANGELO & FATTINI, 2002).

Os órgãos que cumprem tal função são glândulas de secreção interna, assim chamadas por não possuírem dutos, e incluem os testículos, ovários, o pâncreas, as glândulas suprarrenais, a tireoide, a paratireoide, o timo, a hipófise e o tálamo (figura 7).

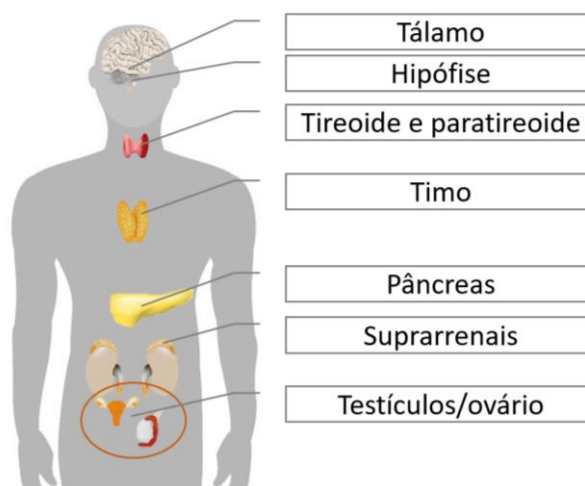


Figura 7: Localização das glândulas do Sistema endócrino no corpo humano.

Isto não significa que os hormônios fiquem restritos às glândulas em si, pois, ao serem produzidos, entram na corrente sanguínea distribuindo para outros sistemas do organismo (DANGELO & FATTINI, 2002). Um exemplo claro é o fígado, que não faz parte do sistema endócrino, e sim do sistema digestivo, mas que atua em conjunto, na medida em que mantém o equilíbrio hormonal por

meio da decomposição do estrógeno e de outros hormônios esteroides, a fim de permitir sua excreção (GHISELLI & JARDIM, 2007).

Dentre os problemas ocasionados pelas alterações no sistema endócrino do organismo humano estão:

- Redução da qualidade espermática
- Atrofia testicular;
- Criptorquidia;
- Impotência;
- Redução da função do sistema imunológico
- Endometriose;
- Alterações do ciclo menstrual;
- Puberdade precoce;
- Problemas comportamentais e neurológicos;
- Diferentes tipos de neoplasias;
- Hipotireoidismo;
- Aborto;
- Natimortos;
- Prematuridade;
- Hipospadia;
- Alterações das glândulas sebáceas;
- Diabetes.

Tais alterações na saúde podem ocorrer mesmo sob a exposição de disruptores endócrinos em baixos níveis de concentração, e pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados, inalação do ar ou contato com solos e sedimentos (WEE & ARIS, 2017).

2.4.2.1. Hormônios esteroidais em matrizes ambientais

Os hormônios esteroidais são compostos que possuem uma estrutura química básica esteroidal contendo quatro anéis fundidos sendo três anéis com seis carbonos e um com cinco (figura 8). São produzidos e secretados pelas glândulas endócrinas, lançadas na corrente sanguínea, e coordenam o funcionamento do organismo como um todo (GHISELLI & JARDIM, 2007).

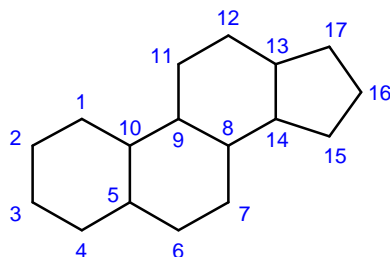


Figura 8: Estrutura básica de um esteroide.

Eles chegam aos ecossistemas aquáticos a partir da excreção natural de seres humanos e animais, uso na pecuária e pelo descarte indevido de alguns medicamentos. Os hormônios esteroidais estão entre os mais potentes disruptores endócrinos (FENT, 2015). Algumas funções que controlam são: atividades de órgãos completos, níveis de sais, açúcares e lípidos no sangue, o uso e armazenamento de energia, o crescimento e o desenvolvimento de organismo, reprodução, características sexuais etc. (GHISELLI & JARDIM, 2007).

Além dos hormônios naturais, temos também os sintéticos, produzidos em laboratórios com a finalidade de substituir, potencializar ou inibir os efeitos dos hormônios naturais. Os hormônios androgênicos e estrogênicos são exemplos de hormônios naturais produzido no organismo humano. Porém alguns hormônios naturais como os progestênicos também podem ser sintéticos e são usados como hormônios de crescimento na pecuária (FENT, 2015). Os androgênicos incluem os hormônios testosterona (T), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (ANDRO) e os metabólitos androstenediol (3α -DIOL), androsterona (ADT) e dihidrotestosterona (DHT).

Os estrogênicos como estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3), são hormônios sexuais feminino produzido pelos ovários. São os estrogênicos que conferem as características femininas das mulheres e regulam o desenvolvimento sexual e a reprodução (TRINH et al., 2011).

O hormônio sintético 17α -etinilestradiol (EE2) é um derivado do hormônio natural E2, e é amplamente utilizado em combinações farmacêuticas de contraceptivos. Efeitos adversos foram observados na reprodução de algumas espécies de peixes devido a exposição a esse hormônio (LIU & WONG, 2013; SANGSTER et al., 2015).

Em grandes cidades, os hormônios E1, E2, E3 e EE2 são comumente encontrados em amostras ambientais de águas e sedimentos, contendo concentrações suficientes para causar efeitos adversos à saúde humana (HAMID & ESKICIOGLU, 2012; CAMILLERI & VULLIET, 2015).

No entanto, estudos evidenciaram que o hormônio natural progesterona (P) é excretado em concentrações mais altas do que os estrogênios (OJOGHORO et al., 2017). E assim como os estrogênios, a progesterona também é um hormônio feminino e tem um papel importante na regulação do ciclo menstrual e na manutenção da gestação. Além do hormônio natural P, várias formas sintéticas de P são agora amplamente produzidas e regularmente usadas em formulações de anticoncepcionais orais e como parte da terapia de reposição hormonal (FAYAD et al., 2013).

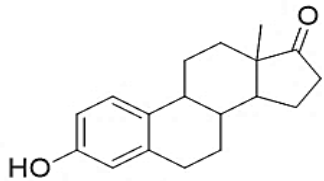
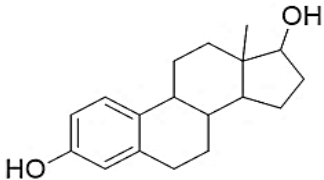
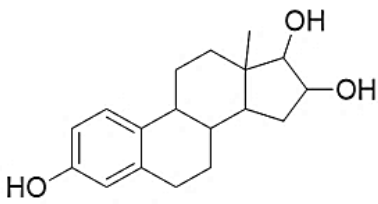
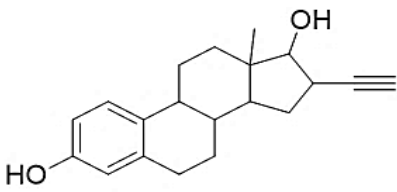
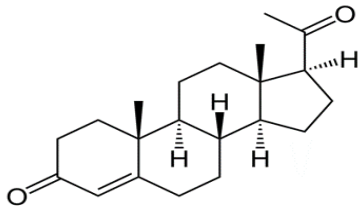
Em todo o mundo, os progestagênios são provavelmente os mais usados de todos os esteroides (ZHANG et al., 2014). O amplo uso reflete nas altas concentrações desse composto encontrado em amostras ambientais em grandes cidades (OJOGHORO et al., 2017).

Pequenas transformações podem ocorrer criando assim outras classes de hormônios, como nos estudos levantados por Sangster et al. (2016), que demonstraram a degradação da progesterona em androgênios no meio ambiente.

A maioria dos estudos sobre determinação de hormônios são realizados em águas. Entretanto, a matriz sedimentar também pode representar um importante compartimento ambiental (SANGSTER et al., 2015), pois os hormônios esteroidais são moderadamente hidrofóbicos e, portanto, podem ser adsorvidos em partículas de argilossilicatos mais.

A tabela 3 apresenta a fórmula molecular, massa molecular, origem e estrutura química dos hormônios comumente utilizados em estudos ambientais.

Tabela 3: Fórmula molecular, massa molecular, origem e estrutura química dos hormônios comumente utilizados em estudos de matrizes ambientais.

| Composto | Fórmula molecular | Massa molecular | Origem | Estrutura Química |
|---|-------------------|-----------------|-----------|--|
| estrone (E1) | $C_{18}H_{22}O_2$ | 270 | natural |  |
| estradiol (E2) | $C_{18}H_{24}O_2$ | 272 | natural |  |
| estriol (E3) | $C_{18}H_{24}O_3$ | 288 | natural |  |
| 17 α - etinilestradiol (EE2) | $C_{20}H_{24}O_2$ | 296 | sintético |  |
| progesterona (P) | $C_{21}H_{30}O_2$ | 314 | natural |  |

Nesse sentido, tais matrizes podem representar fontes acumuladoras de hormônios em ecossistemas aquáticos. A tabela 4 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos hormônios E1, E2, E3, EE2 e P encontrados em amostras ambientais.

Tabela 4: Propriedades químicas dos hormônios esteroidais: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17 α -etinilestradiol (EE2) e progesterona (P).

| Hormônio | Fórmula molecular | Massa molar (g.mol ⁻¹) | Log K _{ow} | K sorção | Solubilidade em água a 20 °C (mg.L ⁻¹) | PKa |
|----------|--|------------------------------------|---------------------|----------|--|------------|
| E1 | C ₁₈ H ₂₂ O ₂ | 270,37 | 3,13 | 4.882 | 30 | 10,4 |
| E2 | C ₁₈ H ₂₄ O ₂ | 272,30 | 4,01 | 3.300 | 3,6 | 10,4 |
| E3 | C ₁₈ H ₂₄ O ₃ | 288,37 | 2,45 | 1.944 | 116 | - |
| EE2 | C ₂₀ H ₂₄ O ₂ | 296,41, | 367 | 4.770 | 441 | 10,46-10,7 |
| P | C ₂₁ H ₃₀ O ₂ | 314,46 | 3,86 | - | - | 18,9 |

2.4.2.2. Técnicas analíticas para a determinação de hormônios esteroidais em matrizes ambientais

Várias metodologias e técnicas têm sido desenvolvidas para a determinação de hormônios em amostras ambientais. Os métodos mais utilizados para extração e pré-concentração de hormônios em matrizes ambientais consistem em Extração de Líquido Pressurizado, Extração Líquido-líquido, QuEChERS - Extração, Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto, Seguro (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), Extração Assistida por Micro-ondas, Extração com Barra de Agitação, Micro Extração em Fase Sólida, Extração via Ultrassom e até mesmo o Soxhlet clássico (MATIC, et al., 2014).

Visando uma boa limpeza (*clean up*) da amostra e concentração do analito, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-phase extraction*) usando cartuchos com fase estacionária C18 ou polimérica, é a técnica mais utilizada para a determinação de hormônios em amostras ambientais (KOZLOWSKA-TYLINGO et al., 2010).

Devido à sua seletividade, sensibilidade e alta precisão, LC-MS/MS (do inglês *Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry*) e GC-MS são as técnicas mais utilizadas para a determinação de hormônios (DARWANO; VO DUY; SAUVE, 2014. Em relação à detecção por espectrometria de massas, a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric-pressure chemical ionization*) e a ionização por *eletrospray* (ESI, do inglês *Electrospray ionization*) são as mais utilizadas para a ionização desses compostos (ISOBONE et al., 2006; CAMILLERI & VULLIET, 2015). As Tabelas

5 e 6 ilustram alguns métodos empregados na determinação de hormônios esteroidais em amostras de sedimento e água, respectivamente

Tabela 5: Métodos para a determinação de hormônios esteroidais em amostras de sedimento.

| Hormônios estudados | Tipo de matriz | Quantidade de amostra | Processo de extração/clean up | Método de detecção | Faixa de LOD (ng g ⁻¹) | Recuperação (%) | Referência |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|---|--------------------|------------------------------------|-----------------|---------------------|
| E1, βE2, E3, EE2, DES, P, NET e LNG | Sedimentos de rio | 5g | -Ultrassom, Metanol/acetona (1: 1) -SPE C18 | LC-DAD-MS | 0,5-5 | 71-103 | ALDA & BARCELÓ 2001 |
| E1, βE2 αE2, E3, ME e βE2Ac | Sedimentos de mar | 10g | -Ultrassom Acetona/DCM (1:1) -Coluna aberta de sílica | GC-MS | 0,8-2,5 | 87-140 | PENG et al 2006 |
| E1, E2 e EE2 | Sedimento de rio | 3g | -Ultrassom, hexano/acetona - SPE Oasis HBL | GC-MS | 1,5-5 | 83-133 | HÁJKOVÁ et al 2007 |
| E1, βE2, EE2 e DES | Sedimentos de lagoa | 5g | Extração por líquido pressurizado -via Dionex - Coluna CPG | GC-MS | 0,24-0,52 | 74-85 | ZHANG et al 2011 |

| Hormônios estudados | Tipo de matriz | Quantidade de amostra | Processo de extração/clean up | Método de detecção | Faixa de LOD (ng g ⁻¹) | Recuperação (%) | Referência |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|--|--------------------|------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| E1, βE2 e EE2 | Sedimentos de rios e lagoas | 1 g | -Micro-ondas doméstico, Metanol/água (3:2) - SPE Oasis HLB | GC-MS | 0,8-5,1 | 91-101 | AZZOUZ & BALLESTEROS, 2012 |
| E1, βE2, E3 e EE2 | Sedimento de estuário | 5g | - Extração acelerada de solvente - SPE Florisil, HLB | LC-ESI-MSMS | 0,05-0,2 | 88-97 | CHEM et al 2012 |
| E1, βE2, E3 e EE2 | Sedimentos de riacho | 0,3 g | Centrifuga, solvente supramolecular | LC-ESI-MSMS | 0,03-0,28 | 93-104 | LÓPEZ-JIMÉNEZ et al 2013 |
| E1, βE2, E3, EE2, QUE e EQUI | Sedimentos de rio | 1g | - EAM, Metanol/água (95:5) | LC-APCI-MSMS | 0,06-0,15 | 92-105 | MATEJICEK et al 2013 |
| E1, βE2, αE2 e E3 | Sedimentos de rios | 2g | -Ultrassom, Metanol -SPE sílica sulfato de sódio anidro | LC-APCI- MSMS | 0,8-18 | 73-118 | MATIC et al 2014 |

| Hormônios estudados | Tipo de matriz | Quantidade de amostra | Processo de extração/clean up | Método de detecção | Faixa de LOD (ng g ⁻¹) | Recuperação (%) | Referência |
|--|-----------------------------|-----------------------|--|--------------------|------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| βE2, EE2, NET, P, MPA e LNG | Sedimentos de rios e esgoto | 0,5-1g | -Ultrassom, Metanol/acetona (3:1) -SPE C18 | LC-APCI- MSMS | 0,7-9,4 | 38 -112 | DARWANO et al 2014 |
| E1, βE2,P e MegA | Sedimentos de rio | 2,5g | -QuEChERS modificado, ACN/iPrOH (90/10) -SPE PSA/C18 | LC-ESI-MSMS | 0,03-0,2 | 74-120 | CAMILLERI e VULLIET 2015 |
| E1, αE2, βE2, E3, T, ADT e P | Sedimentos de rio | 2g | -Ultrassom, Acetato de etila -SPE Oasis HLB | UPLC-ESI-MSMS | 0,02-0,28 | 74-95 | WANG et al 2015 |
| E1, βE2, αE2, E3 e EE2 | Sedimentos de lago | 5g | - Ultrassom, Metanol/DCM (1:1) -SPE Oasis HLB | LC-APCI-MS | 0,3-1,1 | 70-105 | WANG et al 2016 |
| E1, βE2, αE2, EE2, E1S, E2S, E3S, ADT, T, epiT, DHT, P, LNG, CT, CTN, PDN, DXN | Sedimentos de estuário | 10g | -Centrífuga, Metanol/água, 7:3 -SPE Kit dispersivo QuEChERS (5982-4956) | UHPLC-ESI-MSMS | 0,5-2,5 | 76-122 | MULABAGAL et al 2017 |

| Hormônios estudados | Tipo de matriz | Quantidade de amostra | Processo de extração/clean up | Método de detecção | Faixa de LOD (ng g ⁻¹) | Recuperação (%) | Referência |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|---|--------------------|------------------------------------|-----------------|------------------|
| E1, βE2 e EE2 | Sedimentos de rio | 6-7g | -Ultrassom, Metanol - SPE Oasis HLB | GC-MS | 0,003-0,05 | 58-110 | TAN et al 2017 |
| E1, βE2, E3 e EE2 | Sedimento de estuário | 5g | - Extração acelerada de solvente - SPE Florisil, HLB | LC-ESI-MSMS | 0,02-0,2 | 55-103 | LIU et al 2017 |
| E1, αE2, βE2 e E3 | Sedimentos de rio | 2g | -Ultrassom, Acetato de etila - SPE Oasis HLB | UPLC-ESI-MSMS | 0,053-0,28 | 75-85 | ZHANG et al 2019 |

Abreviações dos hormônios: Estrona (E1), 17β-estradiol (βE2), 17α-estradiol (αE2), estriol (E3), 17α-etinilestradiol (EE2), northindrona (NET), medroxyprogesterona (MPA), levonogestrel (LNG), acetato de megestrol (MegA), dietilestilbestrol (DES), mestranol (ME), 17 β -estradiol acetato (β E2Ac), estrona 3-sulfato(E1S), estradiol 3-sulfato (E2S), estriol 3-sulfato (E3S), androsterona (ADT) , testosterona (T), epitestosterona (epiT), 5α- dihydrotestosterone (DHT), progesterona (P), cortisol (CT), cortisona (CTN), prednisolona (PDN), dexamethasone (DXN), equilin (EQU) , equilenin (EQUI), 17bestradiol-17-valerato (EV), eticolanolona (ET), dihidrotestosterona (DHT).

Tabela 6: Métodos para a determinação de hormônios esteroidais em amostras de água.

| Hormônios estudados | Tipo de matriz | Quantidade de amostra | Processo de extração/clean up | Método de detecção | Faixa de LOD (ng L ⁻¹) | Recuperação (%) | Referência |
|--|------------------|-----------------------|--|--------------------|------------------------------------|--|--------------------|
| E1, β E2, E3 e EE2 | Água de rio | 2000ml | - SPE Strata-X poliméricos | LC-UV | 240-510 | 78-101 | STAFIEJ et al 2007 |
| E1, β E2, EE2 | Água de efluente | 1000ml | -SPE C18 | GC-MS(LVI) | 0,031-0,12 | 79-98(10ng/L de PI) 81-91 (1 ng /L de PI) | HU et al 2008 |
| E1, β E2, E3 e EE2 | Água de rio | 50ml | - SPE C18 (pré-concentração) - SPE on-line HPLC | LC-UV | 0,98 -78,1 | 85-112 | WANG et al 2008 |
| E1, β E2, EE2, DES | Água de lagoa | 150ml | - SPE Oasis HLB | GC-MS | 1,0-2,5 | 84-99 | ZHANG et al 2011 |
| E1, α E2, β E2, E3, EE2, ME, LNG, T, ADT, ET, DHT e ADN | Águas de rio | 500ml | -SPE Oasis HLB | GC-EI-MSMS | 0,7-15,8 | 89-109 | TRINH et al 2011 |

| Hormônios estudados | Tipo de matriz | Quantidade de amostra | Processo de extração/clean up | Método de detecção | Faixa de LOD (ng L ⁻¹) | Recuperação (%) | Referência |
|------------------------------|---|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|----------------------|
| E1, E2, EE2, E3 e P | Água potável e de rio | 1000 ml | -SPE Oasis HLB | UHPL-TOF-MS | 0,25-0,50 | 46-134 | WANG et al 2012 |
| E1, βE2, E3, EE2, EQU e EQUI | Águas de rio | 100ml | -SPE Oasis HLB | LC-APCI-MSMS | 0,6-1,3 | 92-101 | MATEJICEK et al 2013 |
| E1, αE2, βE2, E3 e EE2 | Águas de rios, lagos e estações de tratamento de esgoto | 2,5ml | - SPE on-line HPLC | LC-ESI-MSMS | 0,15-0,95 | 75-95 | CIOFI et al 2013 |
| E1, βE2 e E3 | Águas de rio | 2500ml | - SPE C18 | Método ELISA (imuno-analítica) | 0,2-5 | 53-148 | MANICKUM & JOHN 2014 |
| E1, βE2, E3 e EE2 | Águas de Rio | 400 e 1000ml | - SPE Oasis HLB | LC-ESI-MSMS | 0,2- 15 | 70-104 | XU et al 2014 |
| E1, βE2, E3, EE2 e EV | Água de rio | 1000 ml | - SPE C18 Sep-Pak | LC-MSMS | 0,1-2,3 | 61-110 | WANG et al 2015 |
| E1, βE2, αE2, E3 e EE2 | Água de lago | 1000ml | - SPE Oasis HLB | LC-APCI-MS | 0,2-0,5 | 70-105 | WANG et al 2016 |

| Hormônios estudados | Tipo de matriz | Quantidade de amostra | Processo de extração/clean up | Método de detecção | Faixa de LOD (ng L ⁻¹) | Recuperação (%) | Referência |
|---------------------|------------------------|-----------------------|--|--------------------|------------------------------------|---|------------------------|
| E1, βE2, E3 e EE2 | Água de estuário | 2000 ml | -SPE HLB e Florisil | LC-ESI-MSMS | 0,05-0,5 | 61-91 | LIU et al 2017 |
| E1, αE2, βE2 e EE2 | Água de rio | 500ml | -SPE HLB | LC-ESI-MSMS | 0,8-2,4 | 75-102(20ng.L-1 de PI) 74-104(100ng.L-1 de PI) | HE & AGA 2019 |
| E1, α E2, βE2 e E3 | Água de lago | 30ml | -Agitador orbital Metanol/MTBE | LC-ESI-MSMS | 0,07-0,11 | 96-122 | RECHSTEINER et al 2020 |
| E1, βE2 e EE2 | Água de rio e estuário | 8ml | - Microextração líquido-líquido dispersiva | LC-FLD | 3,1-20 | 76-110 | SOUSA et al 2020 |
| E2 e EE2 | Água de riacho | 1000ml | - SPE C18 | LC-ESI-MS | 0,4-30 | 75-89 | COELHO et al 2020 |
| E1, βE2 e E3 | Água de agricultura | 1000 ml | - QuEChERS | LC-ESI-MSMS | 20-33 | 75-111 | SWEENEY et al 2021 |
| E1, βE2,E3 e EE2 | Água de estuário | 20ml | -SPE C18 on-line LC | LC-APCI-HRMS | 0,2-3,9 | 96-101 | BRIAN NG et al 2021 |

Abreviações dos hormônios: Estrona (E1), 17β-estradiol (βE2), 17α-estradiol (αE2), estriol (E3), 17α-etinilestradiol (EE2), levonogestrel (LNG), dietilestilbestrol (DES), mestranol (ME), 17 β -estradiol acetato (β E2Ac), androsterona (ADT) , testosterona (T), epitestosterona (epiT), 5α- dihidrotestosterone (DHT), progesterona (P), cortisona (CTN), prednisolona (PDN), equilin (EQU) , equilenin (EQUI), 17bestradiol-17-valerato (EV), eticolanolona (ET), dihidrotestosterona (DHT).

2.4.2.3. Estudos de determinação de hormônios esteroidais em matrizes ambientais no Brasil

Estudos sobre disruptores endócrinos em matrizes ambientais no Brasil ainda são poucos. A maioria dos trabalhos existentes para contaminantes emergentes, foca em fármacos e pesticidas, enquanto os hormônios representam uma classe pouco explorada nos ambientes aquáticos brasileiros.

Porém, na legislação brasileira ainda não há o monitoramento dos limites de hormônios esteroidais em corpos hídricos. Os estudos realizados com a determinação de hormônios esteroidais na matriz ambiental ao redor do mundo abrangem a avaliação das concentrações encontradas no meio ambiente, tratamento e remediação, avaliação de percepção de risco e, em menor grau, as implicações à saúde humana devido à exposição desses disruptores endócrinos (WEE & ARIS, 2017). A simples detecção de hormônio esteroidal em corpos hídricos remete a indícios de contaminação por esgoto não tratado (MOREIRA et al., 2011).

Podemos destacar alguns trabalhos que nos ajudam a exemplificar os estudos com hormônios em alguns países. Por exemplo, no Rio Po (Itália) e seus tributários, as concentrações do hormônio natural E1 variaram entre 0,7 ng g⁻¹ a 19 ng g⁻¹ sedimento seco (s.s) (LUIGI; GIUSEPPE; CLAUDIO, 2015). Similarmente, para amostras do Rio Bourbre (França), as concentrações de E1 variaram entre 1,1 ng g⁻¹ e 42,6 ng g⁻¹ s.s. (CAMILLERI & VULLIET, 2015)

No Brasil, um estudo realizado no Rio de Janeiro na ETE da Penha, os estrogênios E1 e E2 foram detectados com concentrações médias de 0,021 µg L⁻¹ e 0,040 µg L⁻¹, respectivamente (TERNES et al., 1999).

No artigo publicado por Kuster et al., (2009), no qual analisaram um total de 20 amostras de águas distribuídas pelos rios Paraíba do Sul, Guandú e Macaé, no Canal da Pavuna e em duas lagoas situadas na parte sul do Rio de Janeiro, foram encontrados níveis elevados dos fitoestrogênios daidzeína, coumestrol e genisteína (<366 ng L⁻¹) e concentração de progesterona de até 47 ng L⁻¹. O E3 foi detectado na faixa de 1,00 a 7,27 ng L⁻¹. Os estrogênios E1, E2 e EE2 ficaram abaixo do LOD (Limit of detection).

Em um outro estudo realizado na parte alta do Rio das Velhas (localizado entre Ouro Preto e Nova Lima, no estado de Minas Gerais), cinco disruptores

endócrinos, dentre eles os E2 e EE2, foram analisados em amostras de águas superficiais. As concentrações de E2 e EE2 variaram de 5,6 ng L⁻¹ a 63,8 ng L⁻¹ (MOREIRA et al., 2011).

Amostras do Rio Grande no estado de São Paulo mostraram uma concentração de <1.700 ng L⁻¹ de E2 e <1.200 ng L⁻¹ para EE2 no período seco enquanto que no período chuvoso as concentrações foram de <1.720 ng L⁻¹ para E2 e < 320 para EE2 (COELHO et al., 2020).

No Rio Bacanga, localizado no estado do Maranhão, foram determinadas altas concentrações dos hormônios E1, E2 e EE2 analisados nas amostras de água daquele rio, suas concentrações totais foram 590, 640 e 820 ng L⁻¹ respectivamente (SOUSA et al., 2020).

Torres et al. (2015) determinaram as concentrações de E1, E2, E3, EE2, progesterona e testosterona em amostras de água do Rio Piracicaba no estado de São Paulo. Os autores relatam que algumas amostras apresentaram contaminação pelos hormônios estudados, sendo as concentrações observadas para E1 (14-82 ng L⁻¹), E2 (90-137 ng L⁻¹), E3 (nd-26 ng L⁻¹), EE2 (24-480 ng L⁻¹) significativamente superiores às aquelas relatadas em estudos de outros países ao redor do mundo.

Um outro estudo avaliou as concentrações de hormônios estrogênicos em sedimentos de manguezais do sul e do nordeste brasileiro. Em todas as amostras, os hormônios naturais E1 e E2 e o hormônio sintético EE2 foram detectados. Segundo os autores, as concentrações de E1 variaram de 0,02 ng g⁻¹ a 49,27 ng g⁻¹ s.s., enquanto as concentrações de E2 variaram entre 0,03 ng g⁻¹ e 39,77 ng g⁻¹ s.s., o estrogênio sintético, EE2, foi encontrado em maiores concentrações, variando entre 0,45 e 129,78 ng g⁻¹ s.s. (FROEHNER et al., 2012).

Um estudo em amostras de água tratada e não tratada da região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (na região de SP) mostraram os hormônios E1 <0,54-0,56 µg L⁻¹, E2 <0,59-1 µg L⁻¹ e EE2 <0,56 µg L⁻¹ para água não tratada e somente EE2 (<0,56 µg L⁻¹) foi detectado em amostras de água tratada (OTOMO et al 2010).

No trabalho publicado recentemente por da Cunha et al. (2021), observou-se atividade estrogênica no córrego São Domingos, município de Santa Maria

Madalena (RJ), com concentrações de E2 de 23 ng L⁻¹ a 10,4 ng.L⁻¹ no período seco e chuvoso, respectivamente.

Na região de Campinas (SP), Ghiselli (2006) encontrou concentrações expressivas de disruptores endócrinos, com EE2 variando de 1,2 µg L⁻¹ a 3,5 µg L⁻¹ para água superficial e de 1,6 µg L⁻¹ a 1,9 µg L⁻¹ em água potável.

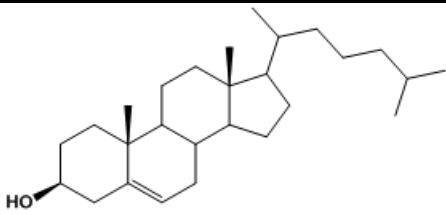
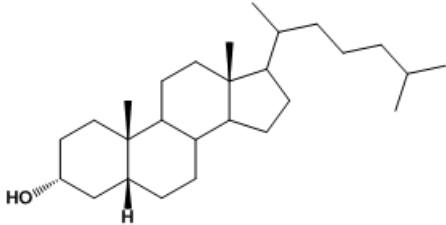
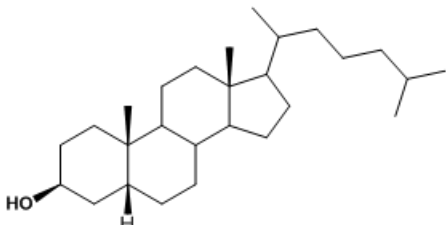
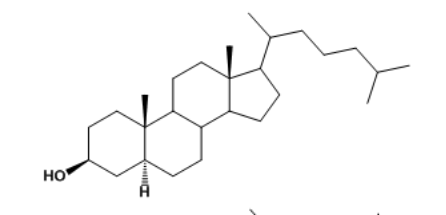
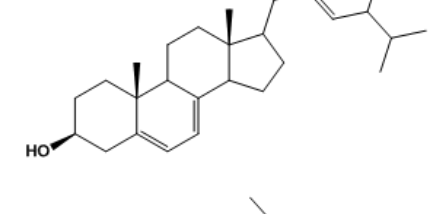
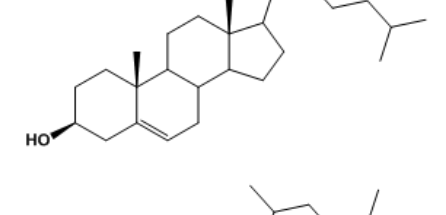
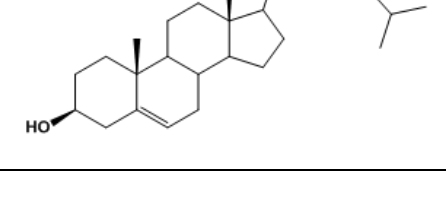
Amostras analisadas por Sodré et al. (2010), coletadas ao longo do Rio Atibaia, no Estado de São Paulo, mostraram as seguintes concentrações de estrogênios: E1 2,2 - 39 ng L⁻¹, E2 0,6 - 7,3 ng L⁻¹, E3 0,6 – 2,3 ng L⁻¹, EE2 nd – 25 ng L⁻¹. O xenostrogênio de 25 ng L⁻¹ a 84 ng L⁻¹.

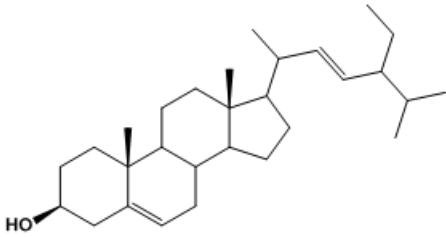
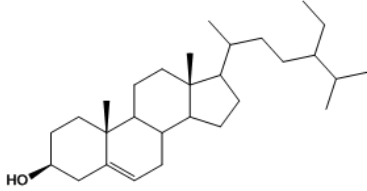
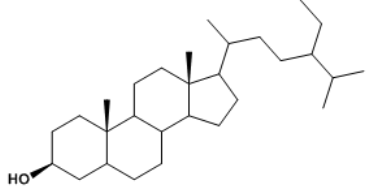
Pusceddu et al. (2019) determinou as concentrações de estrogênios em sedimentos superficiais no sistema Estuarino Santos-São Vicente (SP), encontrando níveis quantificáveis de E3 em todos os locais amostrados, variando de 20,9 ng g⁻¹ a 694,2 ng g⁻¹. Os hormônios E2 e EE2 também foram detectados em quase todos os locais amostrados, com as maiores concentrações sendo de 23,9 ng g⁻¹ e 86,3 ng g⁻¹, respectivamente.

2.4.3. Esteróis

Os esteróis são compostos presentes em todos os organismos com células eucarióticas (VOLKMAN, 2003). Devido à especificidade e relativa resistência estrutural, os esteróis são bastante úteis como marcadores geoquímicos (LEEMING et al., 1996; VOLKMAN, 2003; MARTINS et al., 2012; ABREU-MOTA et al., 2013). Os principais esteróis encontrados em plantas são campesterol, β-sitosterol e stigmasterol, enquanto colesterol e brassicasterol são os principais esteróis indicativos de fontes aquáticas (ABREU-MOTA et al., 2013). As distribuições de esteróis em microrganismo como as microalgas variam de acordo com a espécie, no entanto, frequentemente o colesterol é o esteroide predominante. Similarmente, diatomáceas (microrganismos eucariontes unicelulares que ocorrem nos mais diversos ambientes úmidos e aquáticos, suspensos na coluna d'água ou aderidos a diversos substratos) apresentam o brassicasterol como um dos principais esteróis (VOLKMAN, 2003). Já o coprostanol e epicoprostanol são esteróis fecais utilizados como marcadores antropogênicos (MARTINS et al., 2012; BUJAGIC et al 2016). A tabela 7 apresenta a fórmula molecular, massa molecular, principais fontes e estrutura química dos esteróis mais comumente utilizados em estudos ambientais.

Tabela 7: Fórmula molecular, massa molecular, principais fontes e estrutura química dos esteróis mais comumente utilizados em geoquímica orgânica.

| Composto | Fórmula molecular | Massa molecular | Principais fontes | Estrutura química |
|----------------|-------------------|-----------------|---|--|
| colesterol | $C_{27}H_{46}O$ | 386 | zooplâncton/ fitoplâncton |  |
| epicoprostanol | $C_{27}H_{48}O$ | 388 | esgoto tratado |  |
| coprostanol | $C_{27}H_{48}O$ | 388 | esgoto sem tratamento |  |
| colestanol | $C_{27}H_{48}O$ | 388 | zooplâncton/ fitoplâncton/ degradação |  |
| ergosterol | $C_{28}H_{44}O$ | 396 | Fungos |  |
| brassicasterol | $C_{28}H_{46}O$ | 398 | zooplâncton/ fitoplâncton/ |  |
| campesterol | $C_{28}H_{48}O$ | 400 | plantas superiores |  |

| | | | | |
|---------------------|-----------------|-----|-----------------------------------|--|
| estigmasterol | $C_{29}H_{48}O$ | 412 | plantas superiores |  |
| β -sitosterol | $C_{29}H_{50}O$ | 414 | plantas superiores |  |
| estigmastanol | $C_{29}H_{52}O$ | 416 | plantas superiores/ degradação |  |

O coprostanol é o principal esteroide fecal humano e representa entre 40 e 60% dos esteróis totais encontrados nas fezes humanas (LEEMING et al., 1996). Este esteroide é formado a partir da redução microbiana de colesterol no intestino de mamíferos e, então, eliminado pelas fezes (GRIMALT et al., 1990). Outra fonte minoritária de coprostanol é a produção *in situ* devido à degradação diagenética em sedimentos em ambientes anóxicos (TOLOSA et al., 2014). A figura 9 ilustra as possíveis rotas de degradação do colesterol. O epicoprostanol é um isômero do coprostanol e é utilizado como um indicador de tratamento de esgoto, uma vez que ele é formado durante a etapa de digestão anaeróbica, comum durante o processo de tratamento de esgoto (MARTINS et al., 2012; TOLOSA et al., 2014).

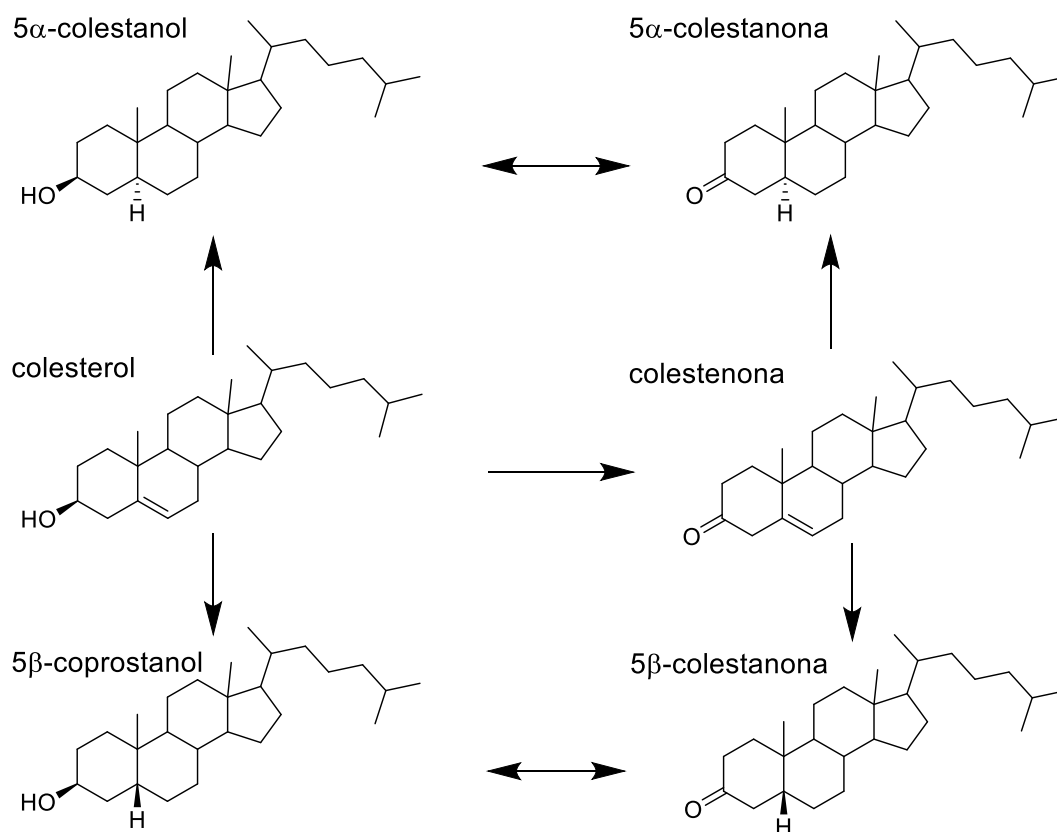
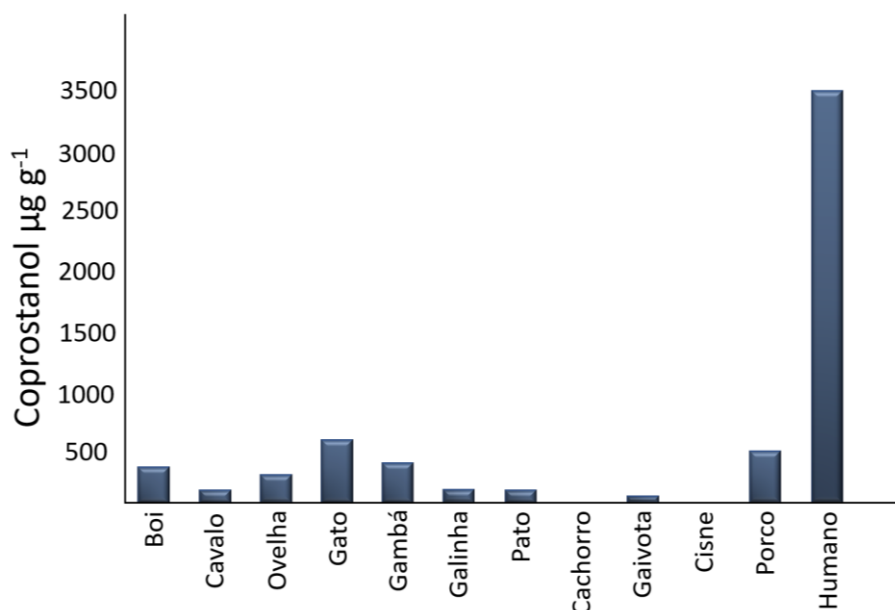


Figura 9: Rotas de degradação do colesterol. Adaptado de GRIMALT (1990).

Considerando que a maior fonte de coprostanol no ambiente é decorrente da presença de fezes e que todos os mamíferos podem contribuir para a sua concentração (MELO et al 2023), alguns estudos têm se focado em revelar a composição de esteróis em diferentes animais (LEEMING et al., 1996; ZOCATELLI et. al., 2017). Gatos e porcos, por exemplo, possuem perfis de esteróis fecais semelhantes ao do homem, porém a concentração de coprostanol nas fezes de seres humanos é cerca de 10 vezes maior (LEEMING et al., 1996).

O gráfico 2 compara as concentrações de coprostanol presente nas fezes de diferentes animais.

Gráfico 2: Comparação das concentrações de coprostanol em fezes de diferentes animais. Adaptado de Leeming et al., (1996).



O gráfico 2 mostra que a concentração de coprostanol é muito maior nas fezes de seres humanos que em outros animais (LEEMING et al., 1996). Desta forma, na ausência de fontes potenciais de coprostanol a partir de fezes de animais, como pecuária e suinocultura, a sua presença em corpos aquáticos pode ser confiavelmente atribuída a fezes humanas (MELO et al., 2023). As "impressões digitais de esteróis" das fezes de seres humanos e de outros animais são suficientemente distintas para diagnosticar a origem da contaminação fecal de corpos aquáticos (LEEMING et al., 1996; ZOCATELLI et al., 2017). Nesse sentido, a determinação de uma série de esteróis proporciona informações mais consistentes e reveladoras sobre as fontes de Matéria Orgânica (MO) de um ambiente (BIRK et al., 2012; MELO et al., 2023).

Para uma avaliação com maior confiabilidade e minimizar a ambiguidade de fontes. A percentagem de coprostanol em relação ao somatório de esteróis indica a contribuição relativa de esgoto doméstico diante de fontes biogênicas, como plantas terrestres e organismos aquáticos para a MO. Também diversos índices diagnósticos têm sido utilizados para corroborar as concentrações absolutas de coprostanol (MARTINS et al., 2014). Venkatesan e Santiago (1989) propuseram o índice epicoprostanol/coprostanol para avaliar o grau de tratamento do esgoto despejado nos corpos aquáticos. A relação entre os

isômeros fecal e natural, coprostanol/(coprostanol + colestanol), também é muito utilizada, onde valores $> 0,7$ são indicativos de contaminação e valores $< 0,3$ são indicativos de ambientes preservados (RESENDE et al., 2014; TOLOSA, et al., 2014; GRIMALT et al., 1990). Valores intermediários são algumas vezes considerados duvidosos, embora alguns autores considerem o intervalo 0,3-0,7 como indicativo de contaminação moderada. O índice coprostanol/colestanol também pode ser utilizada no mesmo sentido, sendo os valores $> 0,2$ indicativos de contaminação por esgoto doméstico (BATAGLION et al., 2016; RESENDE et al., 2014). Outro índice frequentemente utilizado é coprostanol/colesterol, o qual revela a relação entre o coprostanol e seu precursor colesterol. Valores maiores que 0,2 são indicativos de MO de origem antropogênica.

2.4.3.1. Técnicas analíticas para a determinação de esteróis em matrizes ambientais

A técnica de GC-MS é comumente usada para a determinação de esteróis em amostras ambientais (MATIC, et al., 2014). No entanto, o uso de cromatografia gasosa possui certas limitações, como a dificuldade da análise de esteróis sem a etapa de derivatização (ISOBONE et al., 2006). Para aumentar a volatilidade dos esteróis utiliza-se a derivatização, que consiste na conversão do grupo -OH dos esteróis a ésteres trimetil-silícicos, antes da análise por GC-MS (SIMONEIT, 2005; MATIC, et al., 2014), conforme ilustrado na figura 10.



Figura 10: Reação de derivatização do colesterol através da substituição do hidrogênio da hidroxila (-OH) pelo grupo trimetil-silícico (-Si(CH₃)₃) do reagentes N,O-bis(trimetil-silil-trifluoroacetamida)/trimetil-cloro-silano (9:1) (BSTFA/TCMS).

Com o surgimento do acoplamento da técnica de cromatografia líquida com a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), uma nova possibilidade analítica com várias vantagens em relação às técnicas de GC ganhou atenção na área de determinação de compostos em matrizes ambientais. (BATAGLION et al., 2015). A tabela 8 resume as vantagens e desvantagens das técnicas

normalmente aplicadas para a análise de esteróis (BATAGLION et al., 2015; BATAGLION et al., 2016).

Tabela 8: Vantagens e desvantagens das técnicas LC-MS/MS, GC-MS e GC-FID, comumente utilizadas para a determinação de esteróis.

| Técnica | Vantagens | Desvantagens |
|---------------------|--|---|
| LC-MS/MS | <ul style="list-style-type: none"> • Não requer fracionamento do extrato bruto • Alta sensibilidade • Alta seletividade • Análises relativamente mais rápidas • Menores limites de detecção e quantificação • Não necessita de derivatização | <ul style="list-style-type: none"> • Maior custo • Fragmentação limitada |
| GC-MS | <ul style="list-style-type: none"> • Alto poder de resolução • Alta sensibilidade, mas geralmente menor que em LC-MS/MS • Alta seletividade, mas menor que em LC-MS/MS | <ul style="list-style-type: none"> • Limitada a compostos voláteis (ou semivoláteis) e termicamente estáveis • Análises relativamente demoradas • Necessita de derivatização para certos compostos, como esteróis |
| GC-FID ^a | <ul style="list-style-type: none"> • Ampla faixa linear de resposta | <ul style="list-style-type: none"> • Atribuição baseia-se apenas nos tempos de retenção • Baixa seletividade • Limitada a compostos voláteis (ou semivoláteis) e termicamente estáveis • Análises relativamente demoradas • Necessita de derivatização para certos compostos, como esteróis • Baixa resolução para amostras complexas |

Legenda: ^aGC-FID (Cromatografia gasosa acoplada ao detector de íons em chama, do inglês, *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*). Tabela elaborada pelo autor com base em SIMONEIT, 2005; HOFFMANN & STROOBANT, 2007; BATAGLION, et al., 2015.

Devido as vantagens da LC-MS/MS, a técnica tem sido cada vez mais empregada na determinação de esteróis em diferentes matrizes, como óleos comestíveis, plasma e amostras ambientais (LEMBCKE et al 2004; MO et al., 2013; BATAGLION et al., 2015; BATAGLION, et al., 2016; FRENA et al., 2016).

2.4.3.2. Estudos de determinação de esteróis em matrizes ambientais no Brasil

No Brasil, existem relativamente poucos estudos sobre os esteróis como biomarcadores em comparação outros países desenvolvidos. Assim como a cafeína e os hormônios esteroidais, os esteróis não possuem regulamentação na legislação brasileira. Grande parte desses estudos no Brasil são focados na avaliação das fontes de MO em matrizes ambientais, sendo o coprostanol o mais utilizado a fim de determinar o nível de contaminação por esgoto.

Um estudo publicado por Frena et al. (2019), determinou níveis de esteróis em amostras de sedimentos e níveis de coliformes fecais em amostras de águas superficiais coletadas no estuário do Rio Sergipe (SE). Neste estudo, a distribuição de esteróis em sedimentos foi comparada aos coliformes fecais nas amostras de água, e mostrou que não há correlação clara entre o coprostanol e os coliformes. Os autores ainda ressaltam que pode ser devido à alta resistência à degradação do coprostanol nos sedimentos e aos aportes recentes de esgoto nos pontos de coleta de amostras de água.

Na região de Manaus, um artigo publicado por Melo et al. (2019), avaliou as concentrações dez esteróis em sedimentos em três igarapés da cidade. O coprostanol, foi encontrado em altas concentrações (509 ng g^{-1} a 12830 ng g^{-1}) e altas proporções relativas (21-54%) em todas as amostras coletadas no igarapé do Mindu e no igarapé do Quarenta. As amostras do igarapé do Tarumã-açu também apresentaram coprostanol, no entanto, as concentrações ($< \text{LOD} - 142 \text{ ng g}^{-1}$) e as proporções relativas (0-7%) foram muito mais baixas em relação aos outros dois.

Um estudo publicado por Costa, Pessoa e Carreira (2018), determinou os níveis de entrada de esgoto da Baía de Guanabara (RJ), através dos esteróis e coliformes fecais em amostras de água. As concentrações de coprostanol variaram de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ a $206 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que as contagens de coliformes termotolerantes variaram entre $0,4 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^{12}$ NMP/100 mL.

Em um outro estudo, realizado na baía de Paranaguá e na baía de Guaratuba (PR), as amostras de águas foram analisadas através da MOP. As concentrações de coprostanol variaram de $1,00$ e $2,23 \mu\text{g g}^{-1}$ na MOP. Esse artigo mostrou que a temperatura pode afetar a relação entre os indicadores microbiológicos e o coprostanol, uma vez que o valor limite do coprostanol

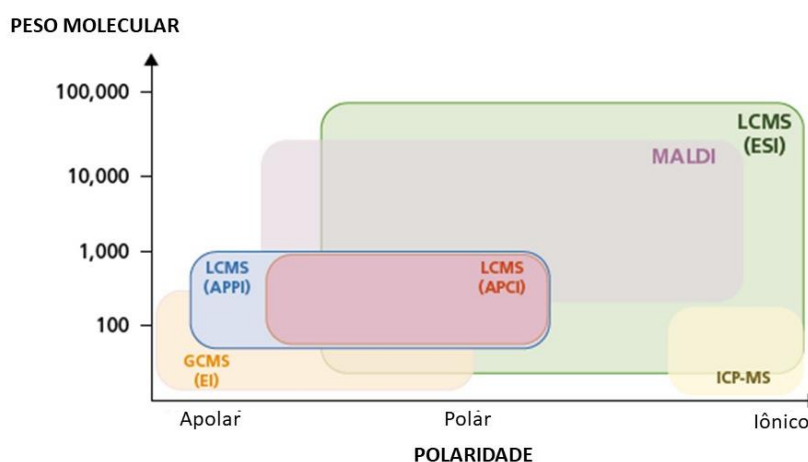
encontrado foi semelhante aos relatados em áreas tropicais, mas inferior aos encontrados durante o inverno em áreas temperadas, reforçando a ideia de que os valores limites devem ser calibrados para diferentes condições climáticas (CABRAL et al., 2018).

2.5. Fundamentos de LC- MS/MS

Para este trabalho, foi utilizado a técnica de LC-MS/MS para a determinação dos objetos do estudo. A técnica LC-MS/MS consiste no acoplamento de cromatografia líquida com espectrometria de massas sequencial (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). Diversos analisadores de massas podem ser acoplados à técnica de separação, sendo o triplo quadrupolo o mais usado para estudos quantitativos (KORFMACHER, 2005).

Existem vários tipos de fontes de ionização a pressão ambiente que podem ser usadas em LC-MS/MS. O gráfico 3 mostra a abrangência de diferentes técnicas de ionização em relação à polaridade e massa molecular.

Gráfico 3: As áreas de análises de compostos em relação à polaridade e massa molecular como determinantes da escolha da fonte de ionização. *Adaptado de <https://www.shimadzu.co.kr>. Acesso em 22 de julho de 2021.*



Em análises por LC-MS/MS, as duas fontes de ionização a pressão atmosférica mais comuns são ESI e APCI (KORFMACHER, 2005).

Para ESI e APCI, uma combinação de alta voltagem e calor é usada para fornecer a ionização necessária para produzir os íons que são analisados pelo

sistema MS. Para o presente trabalho, o APCI foi utilizado como fonte de ionização para todas as análises.

A técnica de APCI é adequada tanto para compostos polares como para compostos de baixa polaridade com massa molecular de até 1500 Da. Como os esteróis e hormônios esteroidais são compostos hidrofóbicos pouco polares e estão dentro da faixa de massa molecular, a técnica de APCI tem apresentado bons resultados para essas classes de compostos (LEMBCKE et al 2005; OJOGHORO et al 2017).

A figura 11 mostra um esquema de uma fonte de APCI e as espécies envolvidas no processo de ionização.

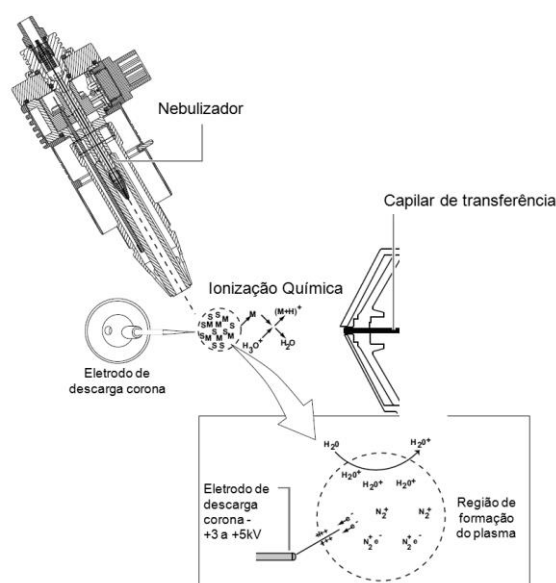


Figura 11: Esquema básico de uma fonte de APCI e as espécies envolvidas no processo de ionização, considerando N_2 como gás nebulizador e água como solvente constituinte da fase móvel. Extraído de <<http://www.iq.unesp.br/>>. Acessado em 15 de janeiro de 2018.

No APCI, o calor é usado para vaporizar a amostra e, em seguida, uma descarga corona é usada para ionizar as moléculas do solvente, que então produzem os íons analitos por meio de mecanismos de ionização química (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; EL-ANEED et al., 2009).

A ionização pode ser realizada no modo negativo ou positivo. No modo negativo, $[M - H]^-$, os íons são produzidos por retirada de prótons ou por íons produzidos por ligação de ânions $[M + X]^-$. No modo positivo de aquisição, ocorre a transferência de prótons ou a adução de íons do gás reagente para produzir os íons $[M + H]^+$ (podendo haver formação de íon radical) para formar íons de

espécies moleculares. Sendo que para este trabalho, o modo positivo foi utilizado (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

No modo positivo, quando ocorre descarga corona no solvente nebulizado, as moléculas de gás N_2 são excitadas e ionizadas, produzindo N_4^+ . A fase móvel evaporada do LC atua como gás de ionização. Se a água for o único solvente na fase móvel evaporada, os íons moleculares de nitrogênio excitados N_4^+ reagiriam com as moléculas de H_2O para produzir íons com $(H_2O)_n$. Então, as moléculas de analito M são protonadas pelos íons do $(H_2O)_n$. Finalmente, os produtos de ionização $MH + (H_2O)$ são transferidos para fora da fonte de íons de pressão atmosférica. A remoção de moléculas de água da molécula de analito protonado ocorre no alto vácuo do analisador de massa (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Durante uma análise por LC-MS/MS, primeiramente ocorre a separação cromatográfica, onde os compostos são separados de acordo com o grau de interação entre a fase móvel e a fase estacionária. Após a separação cromatográfica, os compostos são ionizados em modo positivo ou negativo de ionização. Na sequência, os íons serão analisados de acordo com as suas razões massa-carga (m/z) (AWAD et al 2015). A figura 12 mostra um esquema de um analisador quadrupolo.

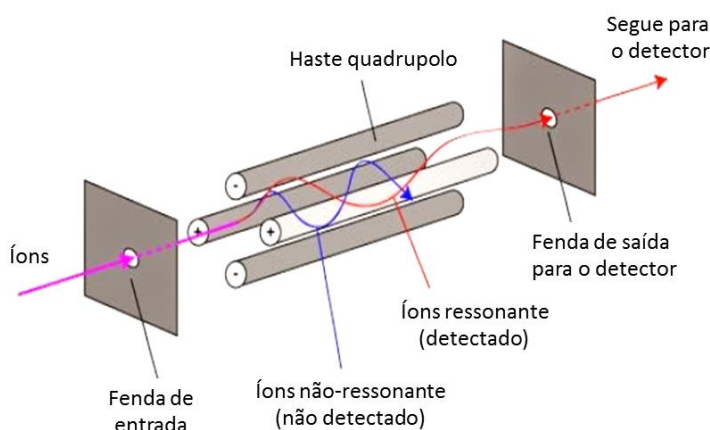


Figura 12: Esquema básico de um analisador do tipo quadrupolo encontrados em LC-MS/MS. Extraído e adaptado de BUSTILLOS et al 2003.

O analisador do tipo quadrupolo consiste basicamente em filtros de íons que permitem apenas a passagem uma determinada m/z que tenha uma

trajetória estável para um determinado conjunto de parâmetros. Cada analisador consiste em quatro hastes metálicas paralelas, nos quais se aplica uma voltagem alternada e uma voltagem contínua. A voltagem contínua oscila alternadamente para cada par de hastes, ou seja, enquanto um par oscila em polaridade negativa, o outro par oscila com polaridade positiva (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). A figura 11 mostra que apenas um íon (cor vermelha) apresenta trajetória estável para alcançar a fenda de saída e seguir para o detector. O outro íon (cor azul) não apresenta trajetória estável para este conjunto de voltagens e bate na haste metálica, não sendo assim detectado (AWAD et al., 2015).

O analisador quadruplo é submetido a variações sequenciais dos potenciais de forma a detectar todos os íons de interesse. O quadrupolo pode ser operado no modo de varredura, no qual os íons de uma determinada faixa de m/z são sequencialmente selecionados, ou no modo de Monitoramento de Íon Selecionado, SIM (do inglês *Selected Ion Monitoring*), no qual apenas m/z preestabelecidas são monitoradas (EL-ANEED et al., 2009).

O analisador quadrupolo é muito utilizado no modo SIM em estudos quantitativos, pois a sua eficiência aumenta e menores limites de detecção e quantificação são alcançados (EL-ANEED et al., 2009).

A determinação de um número maior de compostos pode ser realizada monitorando a fragmentação de vários íons precursores aos seus respectivos íons produtos. Esta forma de análise em espectrometria de massas, onde monitora-se a fragmentação de um íon precursor selecionado no primeiro quadrupolo ao seu correspondente íon produto selecionado no terceiro quadrupolo, é denominada monitoramento de reação selecionada SRM (do inglês, *Selected Reaction Monitoring*) (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Na prática, em modo de SRM, o primeiro e o segundo analisador de massas do triplo quadrupolo operam em modo SIM (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Um esquema ilustrando um equipamento típico de LC-MS/MS é apresentado na figura 13.

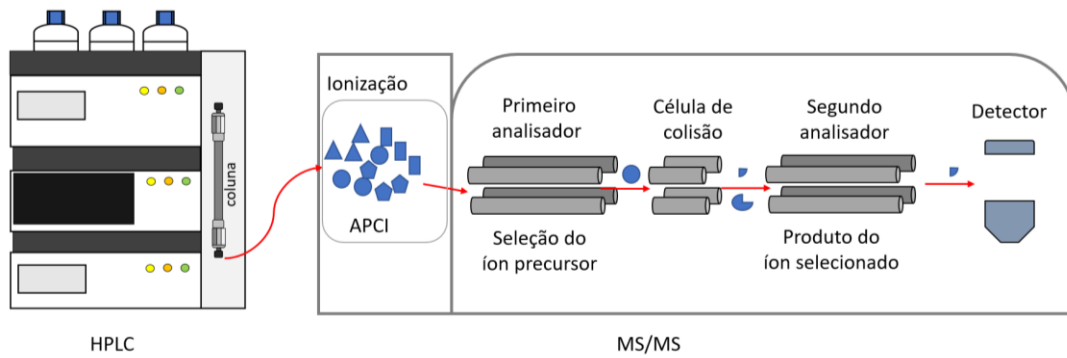


Figura 13: Esquema básico de um equipamento de LC-MS/MS que consiste em um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo equipado com uma fonte de APCI.

O íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo sofre colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente N_2) em uma célula de colisão e, então fragmenta-se aos íons produtos. Estes íons produtos são, então, direcionados ao segundo analisador de massas, onde apenas os íons de interesse serão selecionados de acordo com as suas m/z (EL-ANEED et al., 2009).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar as contribuições de matéria orgânica bem como concordância entre diferentes indicadores químicos de contaminação antropogênica em corpos aquáticos da região da cidade de Manaus.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar as concentrações de cafeína, hormônios e esteróis em amostras de águas superficiais dos igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Tarumã-Açu, Quarenta, Mindu e no Rio Negro;
- Avaliar a distribuição de cafeína e hormônios na matéria orgânica dissolvida e esteróis na matéria orgânica particulada.
- Inferir as possíveis e predominantes fontes contribuintes para a matéria orgânica em cada um dos corpos aquáticos de estudo;
- Comparar os possíveis níveis de contaminação por esgoto doméstico nos corpos aquáticos de estudo;
- Comparar os resultados quantitativos com aqueles observados em outros ambientes brasileiros contaminados e preservados e caracterizar os igarapés da cidade em relação ao grau de contaminação por esgoto doméstico;
- Comparar os diferentes marcadores antropogênicos a fim de avaliar as potencialidades de cada classe;
- Elaborar um novo índice diagnóstico para amostras superficiais de águas doce da região amazônica.

4. Materiais e métodos

4.1. Área de estudo

Para este trabalho, foram escolhidas amostras do Rio Negro e dos principais igarapés das microbacias de Manaus: igarapés da Reserva Adolpho Ducke, Igarapé do Tarumã-Açu, igarapé do Quarenta e igarapé do Mindu.

O Rio Negro é o maior afluente da margem esquerda do Rio Amazonas. Sua cor é, em parte, devido à drenagem dos solos ricos em solutos húmicos, provenientes da matéria orgânica em decomposição da floresta (PINTO et al., 2009). Todo ano, com o degelo nos Andes e a estação das chuvas na região Amazônica, o nível do rio sobe vários metros, alcançando sua máxima entre os meses de junho e julho. O pico coincide com o “verão amazônico”. O nível do rio abaixa até meados de novembro, quando novamente inicia o ciclo da cheia (PINTO et al., 2009).

A Reserva Adolpho Ducke, está situada no divisor de águas de duas principais bacias de drenagem: um para o Rio Amazonas e o outro para o Rio Negro. Os igarapés da reserva são estreitos e de pouca profundidade e passam por uma área densa de mata e muitos deles nascem dentro da própria reserva.

O igarapé Tarumã-Açu é o principal corpo aquático da bacia, localizado na zona oeste da cidade, se encontra no perímetro urbano e compõe um dos maiores tributários do Rio Negro na região. Faz parte da Bacia Hidrográfica do Tarumã-Açu, a qual ocupa uma área de 1372,73 km², o que corresponde a, aproximadamente, 12% do território do município (COSTA, 2020). Grande parte desse igarapé está inserido em áreas de mata. No entanto, nos últimos anos vem sofrendo uma certa influência antrópica devido à presença moradias irregulares, flutuantes e marinas.

O Igarapé do Quarenta passa por bairros antigos e populosos, além de atravessar a área do Polo Industrial de Manaus (PIM). Já o Mindu é o igarapé mais extenso da área urbana de Manaus e sua bacia hidrográfica ocupa aproximadamente 1/4 do território urbano, o qual é ocupado por cerca de 30% da população (BORGES & SANTOS, 2011). Os igarapés do Quarenta e Mindu, são os principais igarapés das microbacias Mindu e Educandos e drenam áreas densamente povoadas desde as suas nascentes até a foz, recebendo resíduos domésticos e industriais, que por sua vez são descarregados no Rio Negro.

Ao todo foram coletadas 36 amostras (figura 14) de água entre maio e julho de 2021. Nesse período ocorre o fenômeno da cheia, época do ano em que as águas dos rios se elevam naturalmente.

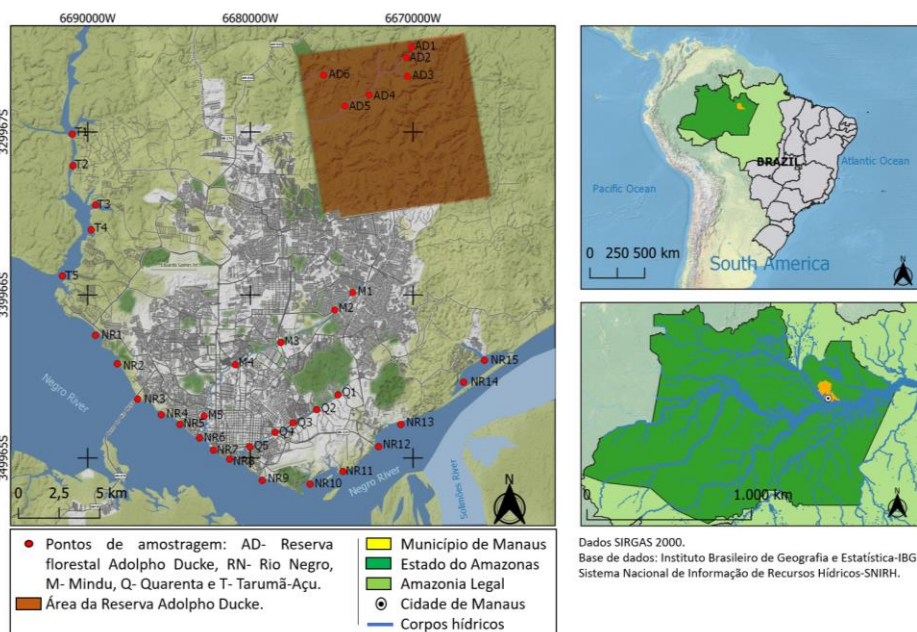


Figura 14: Pontos de coleta das amostras de água no Rio Negro, igarapé do Mindu, igarapé do Quarenta e igarapé do Tarumã-Açu.

O presente estudo buscou englobar três diferentes tipos de locais de amostragem de acordo com a sua natureza. As amostras coletadas em nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke como um local pristino de referência, amostras dos igarapés do Quarenta e Mindu como locais contaminados, e amostras do igarapé Tarumã-Açu e do Rio Negro como locais possivelmente contaminados.

4.2. Coleta das amostras de água

As amostras de água foram coletadas utilizando-se frascos de vidro âmbar previamente lavados com solução Extran 5% (v/v) e enxaguados com água corrente, e após a secagem foi feita a limpeza com etanol por três vezes. Em cada ponto de amostragem foi coletado 1L de água (figura 15). Imediatamente após a coleta, um volume de 20 mL de formaldeído foi adicionado às amostras de água a fim de cessar a atividade microbiana, em seguida foram levadas ao laboratório, para a as etapas de tratamento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 15: Etapas do processo de coleta de amostras de água: a) Frascos âmbar de 1L utilizados na coleta previamente esterilizados. b) Coleta de água. c) Armazenamento das amostras para serem levadas ao laboratório.

As etapas de tratamento das amostras foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Ensaio de Combustíveis (LAPEC), localizado no setor Sul do campus da UFAM/Manaus (figura 16). Apesar do LAPEC ser voltado para o desenvolvimento de pesquisas e monitoramento da qualidade de combustíveis derivados de petróleo e gás natural, o prédio abriga uma diversidade de laboratórios de pesquisa em apoio ao Programa de Pós-graduação em Química.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 16: Laboratório de Pesquisa e Ensaio de Combustíveis (LAPEC), na qual encontra-se o laboratório onde foram realizadas o tratamento das amostras.

4.3. Extração de compostos orgânicos

As amostras de água foram estudadas em relação as frações de MOD e MOP, a fim de determinar as concentrações de cafeína, hormônios e esteróis. A figura 17 ilustra o método utilizado para determinar os diferentes indicadores químicos em amostras de água.

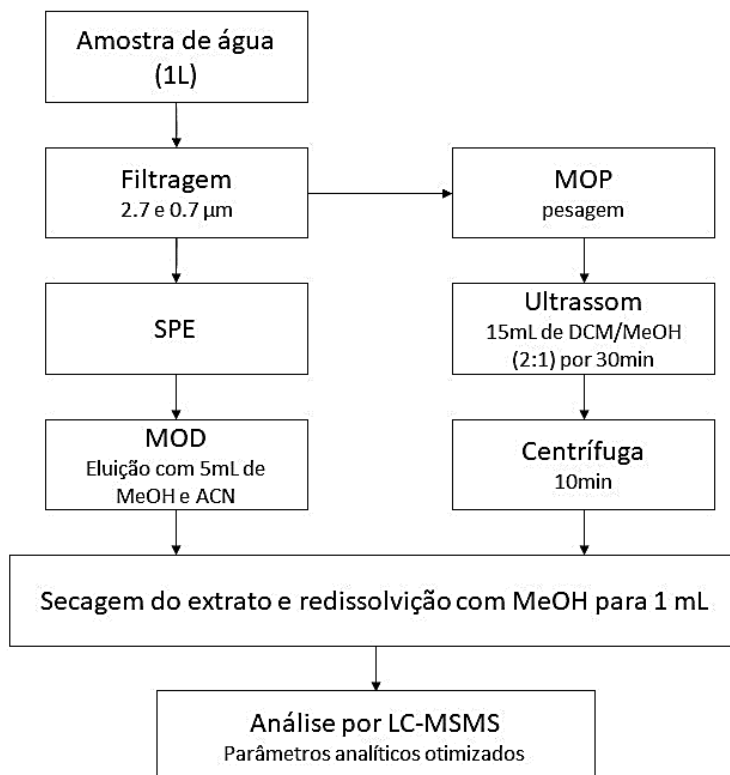


Figura 17: Metodologia utilizada para investigar a presença de diferentes indicadores químicos nas frações de MOD e MOP de amostras de águas superficiais.

Após a coleta, as amostras de água foram filtradas utilizando um sistema filtrante de vidro acoplado a uma bomba a vácuo, conforme ilustrado na figura 18. Os filtros foram inicialmente pesados a fim de se obter a massa de MOP contida amostra de água.

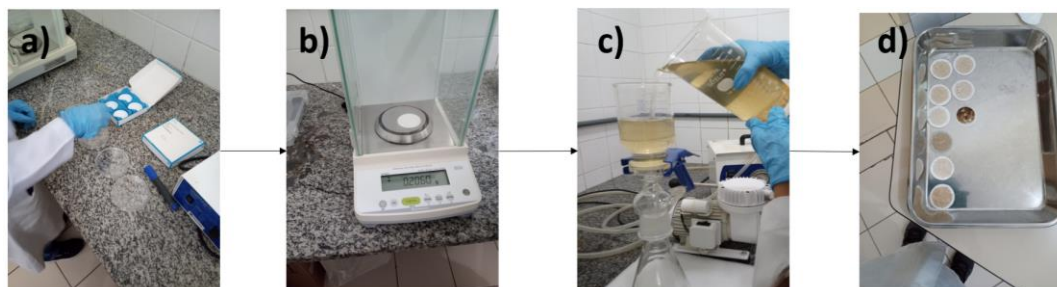


Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 18: Sistema de filtragem de água.

Foram feitas pré-filtrações em filtros qualitativos com o objetivo de reter possíveis partículas maiores como galhos e folhas e, em seguida, foram

utilizados filtros de fibra de vidro com porosidade de 2,7 μm e 0,7 μm a fim de reter a fração de MOP (figura 19).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 19: Filtragem das amostras: a) Pesagem dos filtros das de fibra de vidro com porosidades de 2,7 μm e 0,7 μm . b) Pesagem dos filtros. c) Filtragem das amostras de água. d) Secagem dos filtros para a pesagem e extração.

Após a filtragem das amostras, os diferentes filtros foram secados e pesados e, em seguida, submetidos à extração. A extração dos compostos orgânicos retidos nos filtros foi adaptada de Matic et al 2014, sendo utilizados 15 mL de uma solução de DCM:MeOH (2:1) em banho ultrassônico por 30 min (figura 20).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 20: Extração dos compostos orgânicos a partir da MOP retida nos filtros.

Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um balão. Repetiu-se o processo por mais duas vezes. O extrato combinado foi filtrado em filtro de seringa PTFE (diâmetro 13 mm, poro 0,45 μm) para a remoção de partículas em suspensão. Após o término desse processo, o extrato combinado foi rotaevaporado. Os extratos secos foram redissolvidos em 1 mL de metanol e transferidos para vials para análise cromatográfica.

A amostra de água, após o processo de filtragem ainda contém a parcela de MOD. A partir das amostras de água filtradas, a MOD foi extraída e

concentrados em um sistema de SPE, utilizando cartuchos de fase polimérica (Strata-X 33 μm , 500mg/ 6 mL). Inicialmente, condicionou-se os cartuchos com 5,0 mL de metanol, e depois equilibrou-se com 5,0 mL de água destilada e, em seguida, adicionou-se 1 L de amostra (figura 21).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 21: Sistema de SPE acoplado a bomba a vácuo.

Após a passagem de toda a amostra de água, a eluição dos compostos retidos foi feita com a passagem de 5,0 mL de MeOH, seguida de 5,0 mL de ACN. Os extratos foram secos sob um suave fluxo de gás nitrogênio, sendo posteriormente redissolvidos em 1,0 mL de metanol e transferidos para vials para a análise cromatográfica.

4.4. Análise por LC-MS/MS

As amostras foram analisadas no equipamento LC-MS/MS do Laboratório Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) (figura 22).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 22: Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, localizado no Instituto de Pesquisa da Amazônia-INPA, na qual encontra-se o equipamento LC-MS/MS.

As análises foram realizadas em um LC modelo *1200 series* da Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos da América) acoplado a um espectrômetro de massas modelo API 4000 da Applied Biosystems (Darmstadt, Alemanha) (figura 23).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 23: LC modelo 1200 series (Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas modelo API 4000 (Applied Biosystems), podendo operar com as fontes de ionização ESI ou APCI.

O método para a determinação de cafeína e dos hormônios esteroidais estrona (E), estradiol (E2), estriol (E3), 17 α -etinilestradiol (EE2) e progesterona(P), foi desenvolvido e otimizado nesse estudo. Inicialmente, uma solução de 100 ng mL⁻¹ de cada analito foi individualmente injetada no espectrômetro por infusão direta para a verificação do íon precursor – molécula protonada/desprotonada e/ou possíveis adutos. Na sequência, um experimento de varredura de íons produtos foi realizada para a verificação dos íons produtos. Com os íons precursores e produtos estabelecidos, realizou-se a otimização das voltagens dos quadrupolos, bem como da energia de colisão de cada transição. Após a otimização dos parâmetros relacionados aos analisadores de massas, os parâmetros relativos às fontes de ESI e APCI foram otimizados. Após avaliação dos resultados, estabeleceu-se as seguintes condições instrumentais. O espectrômetro de massas foi utilizado com uma fonte de APCI em modo positivo de ionização, utilizando 5,0 μ A como corrente da agulha de descarga corona e temperatura de 400 °C para dessolvatação. A separação cromatográfica foi otimizada em duas colunas, usando metanol ou acetonitrila como fase móvel orgânica. Água deionizada com e sem aditivos e tampões (acetato e formiato) foram testados como fase móvel aquosa. Após diversos testes, estabeleceu-se a coluna Shimpack XR-ODS III de fase reversa, de 30 mm de comprimento, 2,0

mm de diâmetro interno e 2,2 μm de tamanho de partícula. A separação cromatográfica foi realizada utilizando MeOH e água deionizada como fase móvel, de acordo com o seguinte gradiente de eluição: 0-1 minutos (10% de MeOH), 1-8 minutos (90% de MeOH), e 8-11 minutos (90% de MeOH), 11-12 minutos (10% de MeOH), 12-15 minutos (10% de MeOH), na temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ e vazão de 0,45 mL min^{-1} . A temperatura do amostrador automático foi mantida em 10 $^{\circ}\text{C}$ e o volume de injeção utilizado foi de 5 μL . O espectrômetro de massas foi operado no modo SRM. A tabela 9 apresenta as transições monitoradas para a cafeína e para os hormônios esteroidais.

Tabela 9: Transições monitoradas no método SRM para cafeína e hormônios esteroidais.

| Composto | Fórmula Molecular | Massa Molecular | Transição de Quantificação | Transição de Qualificação |
|-----------------|---|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Cafeína | $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ | 194 | 195>138 | 195>110 |
| E1 | $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$ | 270 | 271>157 | 271>133 |
| E2 | $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$ | 272 | 255>159 | 255>133 |
| E3 | $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$ | 288 | 271>157 | 271>133 |
| EE2 | $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$ | 296 | 279>133 | 279>138 |
| P | $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$ | 315 | 315>109 | 315>297 |

Para a construção das curvas de calibração para a cafeína, optou-se pelo método de padronização externa, sendo as concentrações na faixa entre 1 e 1000 ng mL^{-1} . As áreas do pico da cafeína representam os valores do eixo y, enquanto as concentrações representam o eixo x da curva de calibração. A equação da curva de calibração obtida foi considerada para a quantificação de cafeína nas amostras.

Para a construção das curvas de calibração, optou-se pelo método de padronização interna, sendo as concentrações dos analitos na faixa entre 10 e 1000 ng mL^{-1} e a concentração dos respectivos padrões deuterados de 500 ng mL^{-1} em todos os pontos da curva. A razão entre a área do analito e a área do PI representa os valores do eixo y, enquanto a concentração do analito representa o eixo x da curva de calibração. Para a quantificação dos hormônios nas amostras, foi calculada a razão da área do pico de cada analito pela área do

pico do PI, então as concentrações foram obtidas usando a respectiva equação da curva de calibração.

Os esteróis de interesse foram quantificados por um método analítico previamente desenvolvido e validado por Bataglion e colaboradores (2015). O espectrômetro de massas foi utilizado com uma fonte de APCI em modo positivo de ionização, utilizando 4,0 μA como corrente da agulha de descarga corona e temperatura de 450 $^{\circ}\text{C}$ para dessolvatação. A separação foi realizada utilizando uma coluna Shimpack XR-ODS III de fase reversa, de 150 mm de comprimento, 2,0 mm de diâmetro interno e 2,2 μm de tamanho de partícula.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando MeOH e água deionizada como fase móvel, de acordo com o seguinte gradiente de eluição: 0-2 minutos (90% de MeOH), 2-8 minutos (100% de MeOH), e 8-10 minutos (90% de MeOH), na temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ e vazão de 0,6 mL min^{-1} . A temperatura do amostrador automático foi mantida em 10 $^{\circ}\text{C}$ e o volume de injeção utilizado foi de 5 μL . O espectrômetro de massas foi operado no modo SRM. A tabela 10 apresenta as transições monitoradas para cada esteroide de interesse.

Tabela 10: Transições monitoradas no método SRM para os esteróis de interesse.

| Composto | Fórmula Molecular | Massa Molecular | Transição de Quantificação | Transição de Qualificação |
|---------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Colesterol | $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ | 386 | 369>95 | 369>135 |
| Epicoprostanol | $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}$ | 388 | 371>95 | 371>81 |
| Coprostanol | $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}$ | 388 | 371>95 | 371>81 |
| Colestanol | $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}$ | 388 | 371>95 | 371>81 |
| Ergosterol | $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ | 396 | 379>69 | 379>83 |
| Brassicasterol | $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$ | 398 | 381>69 | 381>135 |
| Campesterol | $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$ | 400 | 383>161 | 383>81 |
| Estigmasterol | $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ | 412 | 395>81 | 395>107 |
| β -Sitosterol | $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ | 414 | 397>95 | 397>81 |
| Estigmastanol | $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}$ | 416 | 399>95 | 399>149 |

Os padrões dos esteróis colesterol, epicoprostanol, coprostanol, colestanol, brassicasterol, ergosterol, estigmasterol, β -sitosterol e sitostanol foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e apresentam pureza maior que 95%. Foram preparadas soluções estoque para cada analito na concentração de 1,0

mg mL⁻¹ em DCM. A partir das soluções individuais, foi preparada uma solução de trabalho contendo todos os analitos na concentração de 2,0 µg mL⁻¹ em DCM, a qual foi utilizada para o preparo das curvas de calibração em MeOH. Para a construção das curvas de calibração, optou-se pelo método de padronização interna, sendo as concentrações dos analitos na faixa entre 10 e 1000 ng mL⁻¹ e a concentração do padrão interno (PI) colesterol-d₆ de 500 ng mL⁻¹ em todos os pontos da curva. A razão entre a área do analito e a área do PI representa os valores do eixo y, enquanto a concentração do analito representa o eixo x da curva de calibração. Para a quantificação dos esteróis nas amostras, foi calculada a razão da área do pico de cada analito pela área do pico do PI, então as concentrações foram obtidas usando a respectiva equação da curva de calibração.

4.5. Tratamento Estatístico

A maioria das análises ambientais, requer uma grande quantidade de amostras e variáveis, resultando em um complexo conjunto de dados que acabam dificultando a tratamento direto dos resultados (AZHAR et al., 2015). Para isso, os métodos estatístico multivariados podem ser uma ferramenta poderosa na avaliação de padrões ambientais (OLSEN; CHAPPELL; LOFTIS. 2012; AZHAR et al., 2015). Os métodos estatísticos multivariados podem ser úteis para avaliar fontes de contaminação e classificação da qualidade da água (OLSEN; CHAPPELL; LOFTIS. 2012). Para este estudo, o tratamento estatístico foi realizado através do software MatLab e foram aplicadas as seguintes técnicas estatísticas multivariadas: Teste T² de Hotelling/Q-residual, Análise de Componentes Principais ou PCA (Principal Component Analysis) e Análise de Agrupamento Hierárquico ou HCA (Hierarchical Cluster Analysis).

4.5.1. Teste T² de Hotelling / Q-residual

Os testes T² de Hotelling e Q-residual são testes distintos bastante utilizados em análises multivariadas em diversas áreas do conhecimento, que quando associados, fornece um método para comprovar se um conjunto de dados diferem entre si significativamente (QIN, 2003; PORWIK; DOROZ; ORCZYK. 2015). Para este estudo o teste T² de Hotelling/Q-residual foi utilizado para detectar pontos *outlier* (anômalos) e assim excluir possíveis amostras que

apresentem prejuízos a interpretação dos resultados (LE et al., 2020). Essa abordagem permite melhorar a capacidade do PCA de reduzir a dimensão dos dados sem perder informações significativas (PLATIKANOV et al., 2021).

4.5.2. PCA

A PCA é o método estatístico multivariado mais aplicado em estudos de bacias hidrográficas, pois reduz efetivamente o número de variáveis através da correlação entre os constituintes da amostra (OLSEN; CHAPPELL; LOFTIS, 2012; MUANGTHONG & SHRESTHA, 2015). Uma vez que as concentrações de compostos podem variar grandemente entre suas proporções devido às diferentes características, um pré-processamento de dados indicado a esse conjunto de dados é o autoescalamento, pois a grande variabilidade nos valores de loadings (valores no gráfico) são corrigidos para que sejam ajustados de modo a estar mais bem distribuído no gráfico de PCA (INDELICATO et al., 2018).

4.5.3. HCA

A HCA é um método comumente utilizado e aplicado para tratamento de diversas variáveis ambientais (VIKASKUMAR et al., 2007; PARRISH; HORACIO; CARRE, 2017). A HCA é um dendrograma (diagrama tipo árvore) que exhibe um conjunto de dados através de agrupamentos, sendo tais grupos organizados através de seus níveis de similaridade, podendo revelar relações entre as amostras (FURTULA et al., 2011; PARRISH; HORACIO; CARRE, 2017). Para este estudo, a HCA também foi realizada com os dados autoescalados, e foi realizada através de duas abordagens. Uma através do agrupamento dos pontos de coleta e outro com o agrupamento da relação entre a cafeína e os esteróis.

5. Resultado e discussão

5.1. Parâmetros analíticos

Para a determinação da recuperação do método utilizado neste trabalho, inicialmente foram determinadas as concentrações de cafeína, hormônios (E1, E2, E3, EE2 e P) e esteróis (colesterol, coprostanol, epicoprostanol, sitostanol, colestanol, estigmasterol, estigmastanol, β -Sitosterol, campesterol, brassicasterol) em uma amostra do igarapé do Tarumã-Açu.

Após a determinação das concentrações nas amostras, foram adicionados padrões de cada analito em três níveis de concentrações nesta mesma amostra, sendo 20, 500 e 1000 ng L⁻¹, para cafeína e esteróis e 10, 100, 500 ng L⁻¹ para os hormônios. Em seguida foi realizada a extração de acordo com a metodologia. Foram comparadas as concentrações teóricas com as das amostras. Foi calculada a recuperação:

$$\% \text{ rec} = \frac{\text{concentração amostra fortificada} - \text{concentração amostra original}}{\text{concentração esperada correspondente à fortificação}} \times 100$$

As curvas de calibração de todos os analitos estão no apêndice X, e foram utilizadas para calcular os LOD e LOQ. Para o cálculo de LOD foi usado $\text{LOD} = 3,3 s / b$, e para o cálculo de LOQ foi usado: $\text{LOQ} = 10 s / b$, onde s- desvio padrão; b- inclinação da curva analítica. A seguir nas tabelas 11 e 12 estão os LOD e LOQ e as recuperações dos analitos deste trabalho.

Tabela 11: Parâmetros analíticos (LOD, LOQ e recuperação) para os hormônios esteroidais.

| Composto | LOD (ng L ⁻¹) | LOQ (ng L ⁻¹) | Recuperação (%) | | |
|----------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | | | 10 ng L ⁻¹ | 100 ng L ⁻¹ | 500 ng L ⁻¹ |
| E1 | 2,98 | 9,82 | 92,15 ± 12,76 | 95,10 ± 15,01 | 95,00 ± 9,11 |
| E2 | 2,78 | 9,18 | 88,10 ± 9,50 | 91,68 ± 9,13 | 92,11 ± 10,78 |
| E3 | 2,47 | 8,15 | 81,45 ± 5,50 | 82,10 ± 7,50 | 90,00 ± 5,11 |
| EE2 | 2,76 | 9,10 | 90,10 ± 7,67 | 94,11 ± 6,81 | 95,48 ± 8,33 |
| P | 0,10 | 0,33 | 95,10 ± 3,41 | 95,88 ± 6,51 | 96,10 ± 4,75 |

Tabela 12: Parâmetros analíticos (LOD, LOQ e recuperação) para cafeína e esteróis.

| Composto | LOD (ng L ⁻¹) | LOQ (ng L ⁻¹) | Recuperação (%) | | |
|----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| | | | 20 ng L ⁻¹ | 500 ng L ⁻¹ | 1000 ng L ⁻¹ |
| Cafeína | 1,15 | 3,83 | 85,15 ± 8,43 | 87,20 ± 6,78 | 88,45 ± 7,18 |
| Colesterol | 6,50 | 21,64 | 92,50 ± 6,78 | 93,45 ± 5,64 | 92,90 ± 5,71 |
| Epicoprostanol | 5,30 | 17,65 | 94,50 ± 5,15 | 95,15 ± 4,48 | 93,45 ± 4,02 |
| Coprostanol | 5,28 | 17,58 | 95,10 ± 5,01 | 95,25 ± 4,96 | 96,15 ± 4,88 |
| Colestanol | 5,89 | 19,61 | 95,14 ± 5,28 | 94,88 ± 4,24 | 98,10 ± 4,50 |
| Ergosterol | 6,45 | 21,48 | 90,10 ± 7,14 | 91,28 ± 6,69 | 93,14 ± 6,15 |
| Brassicasterol | 5,60 | 18,65 | 93,15 ± 6,55 | 94,67 ± 5,36 | 95,10 ± 6,47 |
| Campesterol | 5,24 | 17,45 | 93,72 ± 6,47 | 91,88 ± 6,13 | 94,64 ± 5,93 |
| Estigmasterol | 6,20 | 20,65 | 90,31 ± 4,67 | 91,47 ± 4,23 | 94,20 ± 4,20 |
| β-Sitosterol | 5,15 | 17,15 | 93,55 ± 5,00 | 94,58 ± 4,44 | 93,42 ± 4,03 |
| Estigmastanol | 7,82 | 26,04 | 95,68 ± 3,20 | 94,26 ± 3,68 | 95,15 ± 3,98 |

5.2. Determinação dos analitos nas amostras

As concentrações de cafeína, hormônios esteroidais e esteróis apresentados a seguir referem-se às frações de MOD e MOP, sendo que na fração da MOD foram determinadas as concentrações de cafeína e hormônios e na MOP foram determinadas as concentrações de esteróis. Para este trabalho os analitos foram determinados em suas respectivas frações pelo fato de serem encontradas majoritariamente nestas. A seguir, estão apresentados os resultados obtidos das análises de cafeína, hormônios esteroidais e esteróis em cada um dos igarapés e Rio Negro.

5.3. Igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke

5.3.1. Cafeína

As amostras de água da Reserva Adolpho Ducke foram coletadas em diferentes igarapés, sendo as concentrações de cafeína apresentadas na tabela 13.

Tabela 13: Concentrações de cafeína (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas em diferentes igarapés da Reserva Adolpho Ducke.

| Amostra | Concentração (ng L^{-1}) |
|---------|-------------------------------------|
| AD1 | 108,61 |
| AD2 | 24,58 |
| AD3 | 20,20 |
| AD4 | 43,17 |
| AD5 | 165,78 |
| AD6 | 28,30 |

Oliveira et al (2011) relataram que a região se encontra preservada e sem introdução direta de efluentes e que há no entorno dessa bacia hidrográfica vegetações que produzem cafeína, como cacau e açaí. Dessa forma, as concentrações relatadas para a área estão relacionadas à produção natural do composto estudado. No entanto, devemos levar em consideração as características do local e outros fatores que podem influenciar nas concentrações, como o volume de água do corpo aquático.

Um estudo realizado em uma área de conservação no sudoeste da Geórgia (EUA) relatou concentrações de cafeína de até $14,6 \text{ ng L}^{-1}$. Um dos objetivos do referido trabalho era determinar se as fontes naturais de cafeína eram significativas em áreas despovoadas. A cafeína foi determinada em uma área pantanosa e em dois riachos tributários do rio principal localizados antes dos locais de descarga de águas residuais da cidade. Os autores relatam que embora existam fontes naturais, os níveis de cafeína nesses locais permaneceram abaixo do limite de detecção à medida que o volume de água dos riachos aumenta. Nesse mesmo estudo, foi encontrada uma planta que metaboliza a cafeína e que provavelmente contribui como fonte (PEELER; OPSAHL; CHATON 2006).

A maior concentração de cafeína foi detectada na amostra AD5 que faz parte do igarapé principal (igarapé do Acará, que deságua no Rio Negro) e dentre as amostras, foi a última amostra que foi possível coletar antes do igarapé sair da reserva e entra e para área urbanizada. Uma explicação para sua maior concentração, pode estar associada ao acúmulo de matéria orgânica (MO) vinda ao longo do percurso do igarapé. A amostra AD1 foi a única que foi possível coletar na microbacia do igarapé do Tinga, e faz parte de um dos igarapés adjacentes ao igarapé principal e que deságua no Rio Amazonas (figura 24). De

modo geral, as concentrações de cafeína nas demais amostras não variaram consideravelmente.

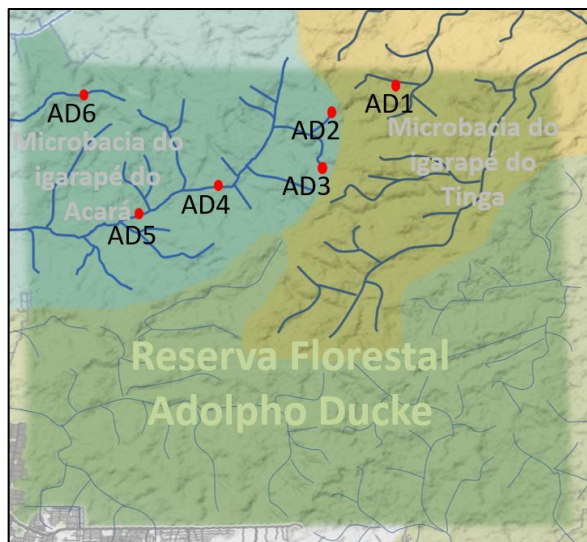


Figura 24: Pontos de amostragem na microbacia dos igarapés do Acará e Tingá, localizado na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

5.3.2. Hormônios Esteroidais

As concentrações dos hormônios estrona, estradiol, estriol, 17α -etinilestradiol e progesterona ficaram abaixo do limite de detecção em todas as amostras dos igarapés da Reserva. Como já mencionado neste trabalho, os hormônios esteroidais encontrados em corpos hídricos são contaminantes emergentes que estão diretamente ligados aos medicamentos. Sendo que sua presença é um forte indício de entrada de esgoto não tratado. Esse resultado reforça a ideia de que a área da Reserva Adolpho Ducke é uma área preservada e que a detecção de possíveis contaminantes encontrados nessa área pode ter origem natural.

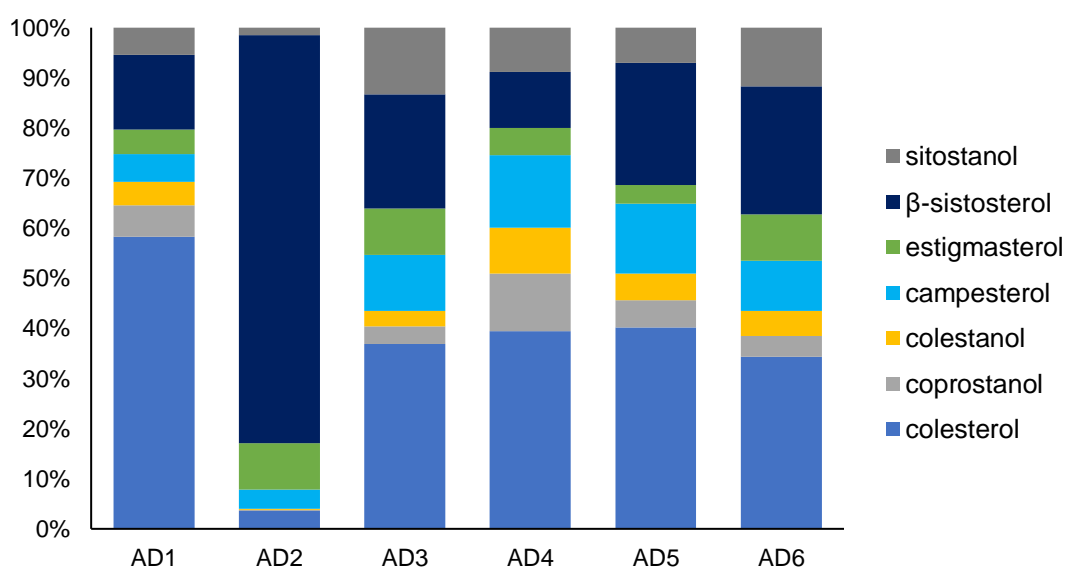
5.3.3. Esteróis

A tabela 14 apresenta as concentrações individuais de cada esterol e o gráfico 4 mostra suas percentagens relativas dos esteróis nas amostras de água coletadas nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke.

Tabela 14: Concentrações de esteróis (ng L⁻¹) nas amostras de água coletadas nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke.

| Composto | Concentração (ng L ⁻¹) | | | | | |
|---------------------|------------------------------------|----------|---------|--------|---------|---------|
| | AD1 | AD2 | AD3 | AD4 | AD5 | AD6 |
| Colesterol | 1123,37 | 402,52 | 515,50 | 379,75 | 427,49 | 536,96 |
| Epicoprostanol | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| Coprostanol | 120,44 | 31,49 | 49,22 | 110,28 | 57,39 | 64,84 |
| Colestanol | 90,33 | 26,10 | 42,46 | 88,22 | 56,87 | 78,35 |
| Campesterol | 107,78 | 427,92 | 156,62 | 139,53 | 148,51 | 156,62 |
| Estigmasterol | 93,55 | 1059,20 | 130,25 | 52,35 | 39,51 | 144,42 |
| β -sitosterol | 288,85 | 9245,72 | 318,13 | 107,52 | 258,83 | 399,07 |
| Sitostanol | 103,75 | 167,69 | 185,59 | 84,75 | 75,12 | 182,66 |
| Total | 1928,05 | 11360,64 | 1397,77 | 962,40 | 1063,71 | 1562,92 |

Gráfico 4: Proporção relativa de esteróis nas amostras de água coletadas nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke.



As concentrações totais de esteróis variaram de 0,96 a 11,36 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a concentração de coprostanol variou de 31,49 a 120,44 ng L^{-1} . Assim, o coprostanol representou de 0,28 a 11,46% do conteúdo total de esteróis conforme mostrado no gráfico 3. O epicoprostanol ficou abaixo do limite de detecção em todas as amostras coletadas na Reserva.

Dentre as amostras coletadas na bacia do igarapé do Acará, as amostras de AD3, AD4, AD5 e AD6 apresentaram concentrações e perfis de esteróis semelhantes. Com exceção da amostra RD2, o colesterol foi o esterol majoritário. Como já mencionado, em ambientes naturais, o colesterol está associado a microrganismos aquáticos, bem como o colestanol, sendo

observado em menores contribuições nesse estudo (VOLKMAN, 2003; ABREU-MOTA et al., 2014). Os esteróis característicos de plantas, como campesterol, estigmasterol e β -sitosterol também apresentaram contribuições significativas. Isso indica que a MO dos igarapés da Reserva Adolpho Ducke tem contribuição equiparável de plantas e microrganismos aquáticos.

Em relação às demais, a amostra AD2 apresentou concentração total de esterol elevada e um distinguível perfil de distribuição. Nessa amostra, a concentração absoluta e a proporção relativa de β -sitosterol foram muito maiores que as dos demais esteróis. O β -sitosterol é um esterol sintetizado, principalmente, por plantas terrestres. É interessante notar que os demais fitoesteróis apresentaram contribuições similares às das demais amostras. Nesse sentido, a amostra AD2 apresentou um resultado anômalo e que deve ser estudado com mais detalhes.

A amostra AD1 foi a única coletada na microbacia do Tinga (porção direita da reserva). Essa amostra apresentou concentrações de esteróis e perfil de distribuição similares aos das amostras AD3, AD4, AD5 e AD6. Embora a contribuição de colesterol tenha sido levemente superior nessa amostra, ainda não podemos inferir que a contribuição de MO aquática é maior na microbacia do Tinga.

O coprostanol foi encontrado em todas as amostras de água coletadas nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke. Apesar de frequentemente ser associado à contaminação por esgoto doméstico, o coprostanol pode eventualmente ter origem natural *in situ* a partir da conversão do colestanol ou do colesterol. Outra possibilidade é a origem a partir de fezes de mamíferos que habitam a reserva. O coprostanol é formado a partir da redução microbiana de colesterol no intestino de mamíferos e, então, eliminado pelas fezes (GRIMALT et al., 1990). Na reserva Adolpho Ducke, existem muitos mamíferos, incluindo de pequeno, médio e grande porte. Foram registradas cerca de 19 espécies de mamíferos, como onças, macacos, tamanduás, veados, cutias, dentre outros (OLIVEIRA et al. 2011). As maiores concentrações de coprostanol foram encontradas nas amostras AD1 e AD4, enquanto as demais amostras chegaram a apresentar menos da metade de tais valores. Essas concentrações podem servir como base para a determinação de coprostanol de origem natural e/ou limiares característicos do ambiente. No entanto, devemos levar em consideração as

características do local, como será discutido na comparação com os demais corpos aquáticos.

Algumas razões diagnósticas podem ajudar a indicar se a origem do coprostanol é natural ou antropogênica. A tabela 15 apresenta duas razões diagnósticas utilizadas para inferir a possível fonte antropogênica.

Tabela 15: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke.

| | coprostanol/ (coprostanol+colestanol) | coprostanol/ colesterol |
|-----|--|------------------------------------|
| AD1 | 0,57 | 0,11 |
| AD2 | 0,54 | 0,07 |
| AD3 | 0,53 | 0,09 |
| AD4 | 0,55 | 0,29 |
| AD5 | 0,50 | 0,13 |
| AD6 | 0,45 | 0,12 |

Na razão coprostanol/(coprostanol + colestanol), valores maiores que 0,7 indicam a contaminação por esgoto, valores entre 0,3 e 0,7 indicam uma incerteza e valores menores que 0,3 indicam que não há contaminação por esgoto. Bujagić et al., (2016) propuseram que valores menores que 0,3 já indicam uma contaminação leve à moderada, enquanto os valores maiores que 0,7 indicam contaminação acentuada. Na razão coprostanol/colesterol, valores maiores que 0,2 já indicam alguma contaminação por esgoto, e valores acima de 1,0 são encontrados em ambientes sob acentuada contaminação (BUJAGIĆ et al., 2016). Tais valores limiares são usados como referências para auxiliar na avaliação de contaminação em estudos com sedimentos. Nesse estudo, as razões diagnósticas foram calculadas afim de avaliar se os limites estabelecidos podem ser usados também em estudos com água.

As amostras de água coletadas na Reserva Adolpho Ducke apresentaram valores para a razão coprostanol/(coprostanol + colestanol) que seriam inconclusivas ou indicativas de um leve aporte MO de origem antrópica, dependendo dos limites adotados. Para a razão coprostanol/colesterol, apenas uma amostra (AD4) apresentou valor indicativo de leve contaminação. Porém, como todas as amostras foram coletadas em uma área preservada, os resultados devem ser interpretados com cuidado. Especialmente para a razão entre os isômeros, nota-se que as concentrações de colestanol são sempre muito baixas, podendo levar a valores superestimados.

5.4. Igarapé do Tarumã-Açu

5.4.1. Cafeína

As amostras de água do igarapé Tarumã-Açu foram coletadas ao longo de cerca de 10 km (do T1 ao T5), abrangendo regiões ocupadas por flutuantes e marinas. A tabela 16 apresenta as concentrações de cafeína para cinco amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu.

Tabela 16: Concentrações de cafeína (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu.

| Amostra | Concentração (ng L^{-1}) |
|---------|-------------------------------------|
| T1 | 41,96 |
| T2 | 26,61 |
| T3 | 29,06 |
| T4 | 47,52 |
| T5 | 30,00 |

As concentrações de cafeína nas amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu variaram de 26,61 a 47,52 ng L^{-1} , as quais estão na mesma ordem de grandeza das concentrações encontradas nas amostras dos igarapés da Reserva Adolpho Ducke. Entretanto, algumas amostras da reserva apresentaram maiores concentrações de cafeína que àquelas do Tarumã-Açu. Nesse sentido, o fator de diluição pode ter influenciado diretamente nas concentrações. Enquanto os igarapés da reserva apresentam pouca profundidade, o Tarumã-Açu é incomparavelmente maior. As baixas concentrações encontradas em todas as amostras refletem o grande volume de água do igarapé associado ao baixo aporte de efluentes domésticos.

Não foi possível observar um aumento considerável nas concentrações de cafeína para as amostras coletadas nas proximidades de marinas e flutuantes. Esses resultados podem estar relacionados ao uso esporádico da maior parte dos flutuantes, com intenso uso apenas nos finais de semana. Por estar em uma área pouco povoada com predominância de vegetação em suas margens, as concentrações de cafeína encontradas no igarapé Tarumã-Açu, possivelmente estão associadas tanto a origem natural quanto antropogênica em áreas de maiores atividades, e em áreas mais distantes dessas atividades possivelmente natural. No entanto, outros indicadores devem ser avaliados para confirmar essa hipótese.

5.4.2. Hormônios esteroidais

A tabela 17 apresenta as concentrações dos hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do Igarapé do Tarumã-Açu.

Tabela 17: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu.

| Compostos | Concentração (ng L^{-1}) | | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| Estrona | 14,89 | < LOD | 14,87 | < LOD | < LOD |
| Estradiol | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| Estriol | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| 17 α -etinilestradiol | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| Progesterona | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |

As concentrações dos hormônios estradiol, estriol, 17 α -etinilestradiol e progesterona ficaram todas abaixo do limite de detecção em todas as amostras do Igarapé do Tarumã-Açu, enquanto que o hormônio estrona foi detectado nas amostras T1 e T3, em concentrações similares.

Uma possível explicação do motivo das amostras T2, T4 e T5 apresentarem as concentrações de hormônios <LOD, é a de que não há fontes significativas próximo a esses locais, associadas ao maior volume de água nesse igarapé.

No ponto de coleta da amostra T1 está a foz do igarapé do Tarumã-Açu no Rio Negro. Isso mostra que alguns hormônios vindos da área urbana têm estabilidade suficiente para persistir no ambiente e ser capaz de se transportado a grandes distancias (ponto coletado a cerca de 300 metros da costa) a partir de sua fonte deste igarapé e podem facilmente chegar ao Rio Negro.

A amostra T3 foi coletada nas proximidades da foz do igarapé do Bolívia com o Tarumã-Açu, que atravessa a zona norte da cidade e tem sua nascente na Reserva Adolpho Ducke. Grande parte desse igarapé sofre com o despejo de esgoto não tratado ao logo de seu percurso, trazendo uma infinidade de contaminantes dentre eles os hormônios.

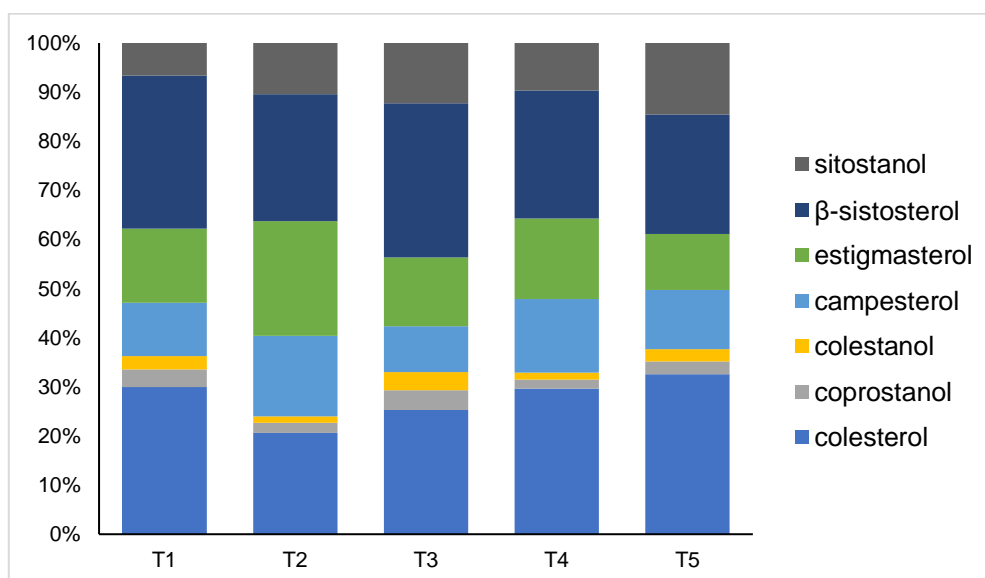
5.4.3. Esteróis

A tabela 18 apresenta as concentrações individuais de cada esterol e o gráfico 5 mostra suas percentagens relativas nas amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu.

Tabela 18: Concentrações de esteróis (ng L^{-1}) nas amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu.

| Compostos | Concentração (ng L^{-1}) | | | | |
|---------------------|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| Colesterol | 486,96 | 415,73 | 263,01 | 493,73 | 432,51 |
| Epicoprostanol | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| Coprostanol | 59,58 | 40,73 | 41,73 | 31,65 | 34,15 |
| Colestanol | 43,14 | 27,09 | 38,36 | 22,75 | 33,19 |
| Campesterol | 176,45 | 330,39 | 97,62 | 250,18 | 158,73 |
| Estigmasterol | 246,03 | 470,32 | 146,23 | 273,86 | 152,38 |
| β -sitosterol | 507,36 | 519,79 | 325,93 | 435,23 | 321,57 |
| Sitostanol | 107,25 | 209,75 | 127,95 | 161,16 | 193,29 |
| Total | 1626,76 | 2013,80 | 1040,84 | 1668,55 | 1325,83 |

Gráfico 5: Proporção relativa de esteróis nas amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu.



As amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu apresentaram concentrações totais de esteróis entre $1,04$ e $2,01 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a concentração de coprostanol variou de $31,65$ a $59,58 \text{ ng L}^{-1}$. Assim, o coprostanol representou de $1,90$ a $4,01\%$ do conteúdo total de esteróis. O epicoprostanol ficou abaixo do limite de detecção em todas as amostras do igarapé Tarumã-Açu.

Observa-se que não há diferença considerável nas concentrações totais de esteróis. Em todas as amostras, houve predomínio dos esteróis de origem biogênica, indicando que as fontes naturais de MO são predominantes em relação às antropogênicas. No igarapé Tarumã-Açu, observa-se que os esteróis provenientes de plantas são predominantes em relação aos de origem aquática.

A presença acentuada de vegetação nas margens do igarapé Tarumã-Açu refletiu-se no predomínio de esteróis como campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e sitostanol.

As amostras T2 e T4 foram coletadas em áreas de balneários. O ponto T2 foi coletado próximo a um local chamado de “Praia Dourada”, local bastante movimentado da área periférica da cidade. O ponto T4 foi coletado próximo a um local chamado de balneário da “Prainha”, área também bastante movimentada da área periférica da cidade. Esses balneários são as principais áreas de lazer frequentadas por banhistas. A amostra T5 foi coletada o mais distante possível de flutuantes e marinas e, supostamente, sofre menos influência da área urbana.

O coprostanol foi encontrado em todas as amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu. A maior concentração de coprostanol foi encontrada na amostra T1, seguida das amostras T2 e T3 que apresentaram concentrações de coprostanol semelhantes. As menores concentrações de coprostanol foram encontradas para as amostras T4 e T5. Nesse sentido, não foi possível relacionar as concentrações de coprostanol com as áreas mais frequentadas para recreação. Embora existam muitos bares flutuantes e marinas no igarapé Tarumã-Açu, os resultados quantitativos de esteróis indicam que o corpo aquático ainda é capaz de depurar a carga orgânica nele lançada.

Em um trabalho publicado pelos autores Costa, Pessoa e Carreira (2018), foi possível propor a concentração de 60 ng L⁻¹ de coprostanol em águas fluviais correspondendo ao critério de 800 NMP/100mL de *E. coli*, estabelecido na legislação brasileira para águas destinadas à recreação de contato primário. Os autores propõem que esse valor seja utilizado como critério adicional junto a colimetria na avaliação da qualidade da água. Todas as amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu apresentaram concentrações de coprostanol abaixo de 60 ng L⁻¹, embora a aplicação de tal limiar para a região de estudo precise ser mais bem avaliada.

Os índices diagnósticos foram determinados a fim de investigar a aplicabilidade em amostras de água. Na tabela 19 estão apresentados os índices para as amostras coletadas no igarapé Tarumã-Açu.

Tabela 19: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico no igarapé Tarumã-Açu.

| | coprostanol/ (coprostanol+colestanol) | coprostanol/ colesterol |
|----|--|------------------------------------|
| T1 | 0,58 | 0,12 |
| T2 | 0,60 | 0,09 |
| T3 | 0,52 | 0,15 |
| T4 | 0,58 | 0,06 |
| T5 | 0,50 | 0,07 |

As amostras de água coletadas no igarapé Tarumã-Açu apresentaram valores para a razão coprostanol/(coprostanol + colestanol) que seriam inconclusivas ou indicativas leve aporte de MO de origem antrópica. Entretanto, nenhuma das amostras apresentou razão coprostanol/colesterol indicativa de contaminação. Essa contradição pode ser devido à baixa concentração de colestanol, o que acarreta um aumento da razão entre os homólogos saturados. Aparentemente, a razão entre o estanol fecal e seu esterol precursor parece mais adequada para avaliar contaminação por esgoto nos corpos aquáticos estudados.

5.5. Igarapé do Quarenta

5.5.1. Cafeína

As amostras de água do igarapé do Quarenta foram coletadas ao longo de cerca de 7 km (do Q1 ao Q5). A tabela 20 apresenta as concentrações de cafeína das cinco amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta.

Tabela 20: Concentrações de cafeína em amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta.

| Amostra | Concentração (ng L⁻¹) | Concentração (µg L⁻¹) |
|----------------|---|---|
| Q1 | 15866,95 | 15,87 |
| Q2 | 16883,05 | 16,88 |
| Q3 | 60082,01 | 60,08 |
| Q4 | 47783,65 | 47,78 |
| Q5 | 1466,70 | 1,47 |

As amostras de águas coletadas no igarapé do Quarenta apresentaram concentrações de cafeína elevadas que variaram entre 1466,70 e 60082,01 ng L⁻¹. As amostras Q3 e Q4 apresentaram as maiores concentrações de cafeína. Ao longo do igarapé do Quarenta, nas proximidades dos pontos de coleta das

amostras Q3 e Q4, encontram-se bairros bastante populosos, como Japiim, Petrópolis, Raiz, Betânia e Morro da Liberdade e o distrito industrial de Manaus. Essa maior densidade populacional pode explicar as maiores concentrações de cafeína encontradas nas amostras Q3 e Q4.

A amostra Q5 apresentou a menor concentração de cafeína. Neste ponto de coleta, o volume de água é muito superior ao dos outros pontos. O referido local é próximo ao desague do igarapé do Quarenta no Rio Negro. Pelo fato de a coleta ter sido realizada no período de cheia (julho), o fator de diluição influenciou diretamente na concentração de cafeína da amostra Q5.

Em um trabalho com amostras do rio Ochlockonee (EUA) e de seus afluentes, Peeler, Opsahl e Chaton (2006), verificaram que à medida que as águas desses locais fluíam em direção ao rio Ochlockonee, a cafeína se tornava indetectável. A degradação da cafeína pode ocorrer ao longo do percurso, mas a diluição é uma explicação mais provável devido aos elevados volumes de água do igarapé.

5.5.2. Hormônios esteroidais

A tabela 21 apresenta as concentrações dos hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do Igarapé do Quarenta.

Tabela 21: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta.

| Compostos | Concentração (ng L^{-1}) | | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q5 |
| Estrona | 22,37 | 21,36 | 36,39 | 37,97 | 15,44 |
| Estradiol | 19,03 | 18,46 | 14,22 | 13,50 | < LOD |
| Estriol | 10,04 | 12,65 | 15,95 | < LOD | < LOD |
| 17 α -etinilestradiol | 17,40 | 11,66 | 12,73 | < LOD | < LOD |
| Progesterona | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |

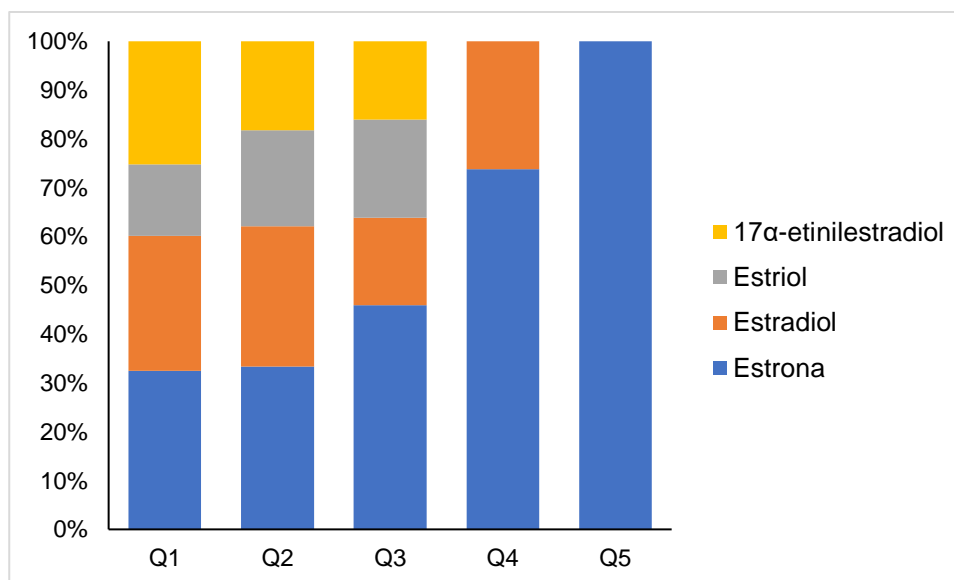
Nas amostras de Q1 a Q3, foi possível detectar os hormônios estrona, estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol, na Q4, estrona e estradiol e na Q5 apenas a estrona. As concentrações do hormônio progesterona ficaram todas abaixo do limite de detecção em todas as amostras do Igarapé do Quarenta. Em contrapartida, a estrona foi o único hormônio detectado em todas as amostras.

As concentrações de hormônios estão na mesma ordem de grandeza, sendo que as amostras variaram da seguinte forma: a estrona, de 15,44 a 37,97

ng L⁻¹, o estradiol de <LOD a 19,03 ng L⁻¹, o estriol de <LOD a 15,95 ng L⁻¹ e o 17 α -etinilestradiol de <LOD a 17,40 ng L⁻¹.

No gráfico 6, mostra o perfil de distribuição dos hormônios através de suas percentagens relativas nas amostras de água coletadas nos igarapés do Quarenta.

Gráfico 6: Perfil de distribuição de hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do igarapé do Quarenta.



As amostras Q1, Q2 e Q3 apresentam um perfil de distribuição semelhante, na amostra Q4, dos dois hormônios detectados, a estrona é o majoritário.

Na amostra Q5, em que somente a estrona foi detectada, representando 100 % dos hormônios detectados para este ponto e apresentou o menor valor dentre as concentrações, reforçando a ideia de que o fator de diluição influencia diretamente nas concentrações.

5.5.3. Esteróis

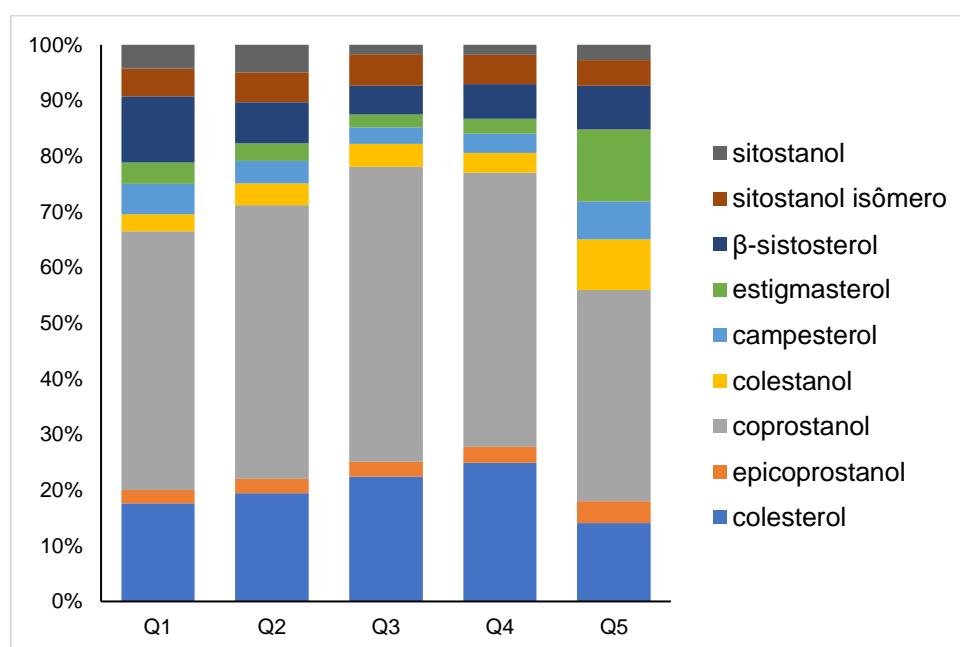
A tabela 22 apresenta as concentrações individuais de cada esterol e o gráfico 7 mostra suas percentagens relativas nas amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta.

Tabela 22: Concentrações de esteróis ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta.

| Composto | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | | |
|----------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|------|
| | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q5 |
| Colesterol | 6,35 | 4,50 | 11,19 | 18,66 | 1,07 |
| Epicoprostanol | 0,86 | 0,59 | 1,34 | 2,21 | 0,30 |
| Coprostanol | 16,72 | 11,34 | 26,40 | 36,93 | 2,88 |

| | | | | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Colestanol | 1,09 | 0,91 | 2,04 | 2,67 | 0,69 |
| Campesterol | 1,97 | 0,94 | 1,50 | 2,59 | 0,52 |
| Estigmasterol | 1,40 | 0,72 | 1,13 | 2,00 | 0,98 |
| β -sitosterol | 4,27 | 1,72 | 2,61 | 4,64 | 0,60 |
| Sitostanol (isômero) | 1,78 | 1,22 | 2,79 | 3,93 | 0,35 |
| Sitostanol | 1,54 | 1,15 | 0,86 | 1,38 | 0,21 |
| Total | 35,98 | 23,09 | 49,87 | 75,01 | 7,59 |

Gráfico 7: Proporção relativa de esteróis nas amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta.



As amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta apresentaram concentrações totais de esteróis entre 7,59 e 75,01 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a concentração de coprostanol variou de 2,88 a 36,93 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, o coprostanol representou de 37,94 a 52,94% do conteúdo total de esteróis, sendo majoritário em todas as amostras.

Assim como para a cafeína e o hormônio estrona, as maiores concentrações de coprostanol foram encontradas nas amostras Q3 e Q4, provavelmente devido estarem localizados em meio aos bairros populosos da região da cidade bem como o distrito industrial de Manaus, como mencionado anteriormente.

A amostra Q5 apresentou a menor concentração total de esteróis, assim como as menores concentrações para a maioria dos compostos, inclusive para o coprostanol devido ao fator de diluição.

As amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta apresentaram perfis de distribuição de esteróis semelhantes, conforme podemos ver no gráfico 6, especialmente as amostras Q1-Q4 que não são influenciadas pela entrada de Rio Negro. As amostras de água do igarapé do Quarenta apresentaram baixas proporções dos esteróis biomarcadores campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e sitostanol, que são característicos de plantas. Em todas as amostras, o coprostanol foi o esteroide majoritário, revelando o acentuado aporte de esgoto não tratado.

Todas as amostras coletadas no igarapé do Quarenta apresentaram concentração de coprostanol muito acima do valor limite de 60 ng L⁻¹, sugerido por Costa; Pessoa; Carreira, 2018. Portanto, apesar da variação das concentrações absolutas e relativas de coprostanol, todas as amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta são classificadas como altamente submetidas ao aporte de esgoto doméstico. Nem mesmo as amostras coletadas próximas às áreas com presença de vegetação apresentaram consideráveis proporções de fitoesteróis.

Um ponto importante a se destacar é que em todas as amostras foi detectada a presença de epicoprostanol. Vale ressaltar que esse isômero do coprostanol é bastante usado como um indicador do nível de tratamento de esgoto. No entanto, as fezes humanas também contêm esse isômero em baixas concentrações, com isso a presença de epicoprostanol nas amostras deve ser decorrente tanto de sua presença nos esgotos não tratados quanto do despejo de esgoto tratado.

Os índices diagnósticos foram determinados a fim de investigar a aplicabilidade em amostras de água. Na tabela 23 estão apresentados os índices para as amostras coletadas no igarapé do Quarenta.

Tabela 23: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico no igarapé do Quarenta.

| | coprostanol/ (coprostanol+colestanol) | coprostanol/ colesterol | coprostanol/ epicoprostanol |
|----|--|------------------------------------|--|
| Q1 | 0,93 | 2,63 | 19,37 |
| Q2 | 0,92 | 2,51 | 19,08 |
| Q3 | 0,92 | 2,36 | 19,69 |
| Q4 | 0,93 | 1,97 | 16,74 |
| Q5 | 0,80 | 2,69 | 9,69 |

Todas as amostras de água coletadas no igarapé do Quarenta apresentaram o índice coprostanol/(coprostanol + colestanol) maior que 0,7, valor indicativo de contaminação acentuada por esgoto doméstico. Similarmente, todas as amostras apresentaram o índice coprostanol/colesterol maior que 1,0, indicando que o esterol fecal está presente em maior abundância que seu precursor biológico. Por fim, o índice epicoprostanol/coprostanol apresentou-se muito superior a 1,5 para todas as amostras, indicando que o igarapé do Quarenta recebe ao longo de sua extensão esgoto doméstico não tratado.

As razões diagnósticas obtidas para as amostras do igarapé do Quarenta revelam que, em situações de contaminação acentuada, todos os valores convergem para a mesma interpretação. Os valores para o índice coprostanol/(coprostanol + colestanol) muito próximos à unidade indicam que o isômero fecal corresponde quase que à totalidade dos homólogos saturados. Simultaneamente, os índices coprostanol/colesterol assumem valores muito maiores que o limiar considerado aceitável para ambientes prístinos.

5.6. Igarapé do Mindu

5.6.1. Cafeína

As amostras de água do igarapé do Mindu foram coletadas ao longo de cerca de 14 km (do M1 ao M2). A tabela 24 apresenta as concentrações de cafeína para cinco amostras de água coletadas no igarapé do Mindu.

Tabela 24: Concentrações de cafeína em amostras de água coletadas no igarapé do Mindu.

| Amostra | Concentração (ng L ⁻¹) | Concentração (µg L ⁻¹) |
|---------|------------------------------------|------------------------------------|
| M1 | 69654,99 | 69,65 |
| M2 | 49890,27 | 49,89 |
| M3 | 17121,08 | 17,12 |
| M4 | 17401,56 | 17,40 |
| M5 | 4490,52 | 4,49 |

As amostras de água coletadas no igarapé do Mindu apresentaram concentrações de cafeína entre 4490,52 e 69654,99 ng L⁻¹. As amostras M1 e M2 apresentaram as maiores concentrações de cafeína, são pontos localizados em áreas com a alta densidade populacional dos bairros, como Cidade Nova, Nova Cidade, Jorge Teixeira e Tancredo Neves.

As amostras M3 e M4 foram coletadas em áreas denominadas corredores ecológicos, onde há uma faixa de área verde ao redor do Igarapé. Apesar dos parques municipais com áreas verdes, como o Parque Municipal do Mindu, a região abrange bairros nobres, como Aleixo, Parque 10 de novembro e Adrianópolis. Nessa região da cidade, há um aumento do número de condomínios residenciais, os quais normalmente possuem suas próprias estações de tratamento de esgoto. Essa mudança no uso/ocupação de terras e disposição/tratamento de efluentes pode estar relacionada ao decréscimo das concentrações de cafeína nas amostras M3 e M4.

A amostra M5, apresentou a menor concentração de cafeína. No ponto de coleta da amostra M5, o volume de água é muito superior ao dos outros pontos devido ao encontro com o Rio Negro. Portanto, acredita-se que o fator de diluição influenciou diretamente na concentração absoluta de cafeína, bem como ocorreu na amostra Q5, visto anteriormente.

5.6.2. Hormônios esteroidais

A tabela 25 apresenta as concentrações dos hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do Igarapé do Mindu.

Tabela 25: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas no Igarapé do Mindu.

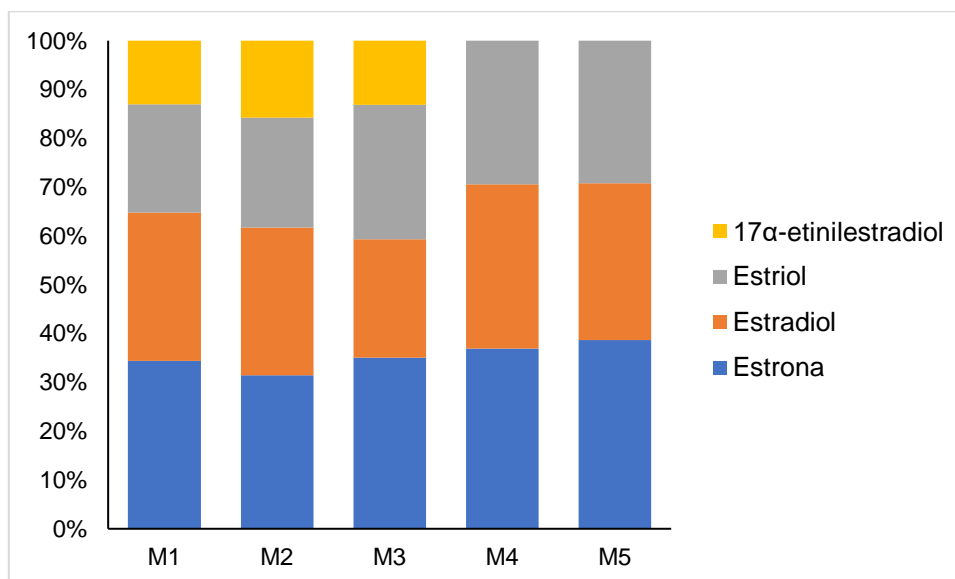
| Compostos | Concentração (ng L^{-1}) | | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
| Estrona | 50,66 | 46,63 | 46,92 | 19,57 | 18,85 |
| Estradiol | 44,83 | 44,75 | 32,51 | 17,84 | 15,60 |
| Estriol | 32,71 | 33,22 | 36,76 | 15,62 | 14,25 |
| 17 α -etinilestradiol | 19,17 | 23,40 | 17,65 | < LOD | < LOD |
| Progesterona | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |

Nas amostras de M1 a M3, foi possível detectar os hormônios estrona, estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol, nas amostras M4 e M5, estrona, estradiol e estriol. As concentrações do hormônio progesterona ficaram todas abaixo do limite de detecção em todas as amostras do Igarapé do Mindu.

As concentrações de hormônios estão na mesma ordem de grandeza, sendo que as amostras variaram da seguinte forma: a estrona, de 18,85 a 50,66 ng L^{-1} , o estradiol de 15,60 a 32,71 ng L^{-1} , o estriol de 14,25 a 36,76 ng L^{-1} e o 17 α -etinilestradiol de <LOD a 23,40 ng L^{-1} . No gráfico 8, mostra o perfil de

distribuição dos hormônios através de suas percentagens relativas nas amostras de água coletadas nos igarapés do Mindu.

Gráfico 8: Perfil de distribuição de hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do igarapé do Mindu.



As amostras M1, M2 e M3 apresentam um perfil de distribuição semelhante. Na amostra Q4, dos dois hormônios detectados, a estrona é o majoritário. As amostras M4 e M5 apresentaram um perfil de distribuição semelhante, sendo que na amostra M5 também apresentou o menor valor de concentrações, devido ao fator de diluição.

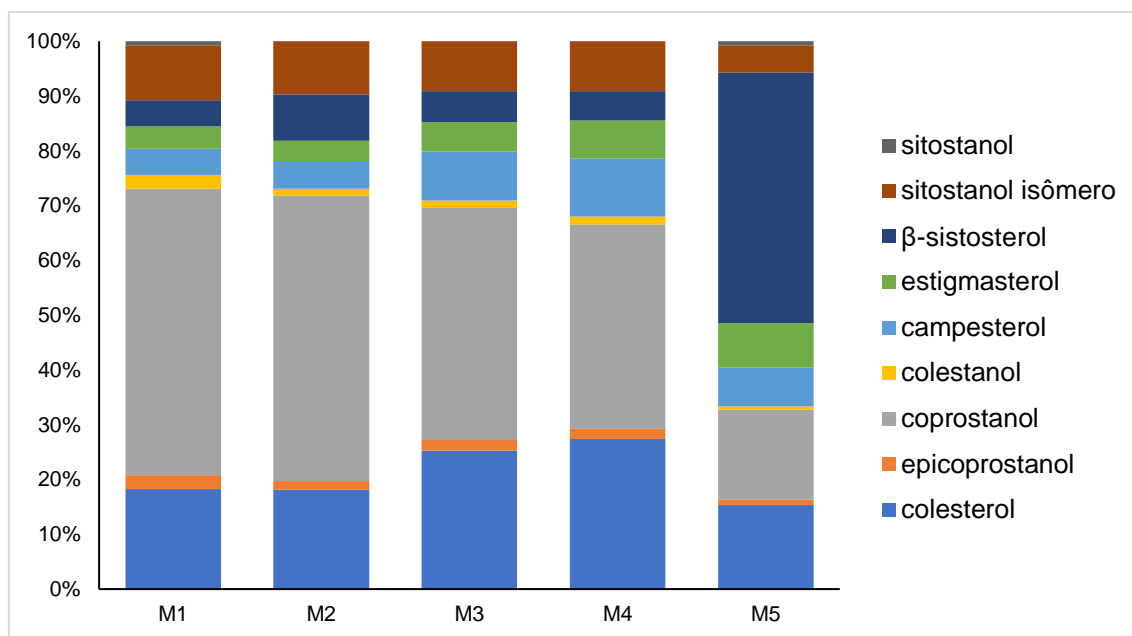
5.6.3. Esteróis

A tabela 26 apresenta as concentrações individuais de cada esterol e o gráfico 9 mostra suas percentagens relativas nas amostras de água coletadas no igarapé do Mindu.

Tabela 26: Concentrações de esteróis nas amostras de água do igarapé do Mindu.

| Composto | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | | |
|----------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
| Colesterol | 16,35 | 16,26 | 8,92 | 7,80 | 9,58 |
| Epicoprostanol | 2,28 | 1,36 | 0,69 | 0,55 | 0,63 |
| Coprostanol | 46,92 | 46,63 | 14,94 | 10,63 | 10,23 |
| Colestanol | 2,21 | 1,19 | 0,49 | 0,40 | 0,41 |
| Campesterol | 4,29 | 4,46 | 3,16 | 3,04 | 4,40 |
| Estigmasterol | 3,68 | 3,32 | 1,89 | 1,96 | 5,07 |
| β -sitosterol | 4,28 | 7,59 | 2,01 | 1,52 | 28,58 |
| sitostanol (isômero) | 9,03 | 8,69 | 3,21 | 2,61 | 3,10 |
| Sitostanol | 0,64 | < LOD | < LOD | < LOD | 0,47 |
| Total | 89,67 | 89,50 | 35,31 | 28,50 | 62,47 |

Gráfico 9: Proporção relativa de esteróis das amostras do igarapé do Mindu.



As amostras de água coletadas no igarapé do Mindu apresentaram concentrações totais de esteróis entre 28,50 e 89,67 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a concentração de coprostanol variou de 10,23 a 46,92 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, o coprostanol representou de 16,38 a 52,33% do conteúdo total de esteróis.

As amostras M1 e M2 apresentaram as maiores concentrações totais de esteróis, bem como as maiores concentrações absolutas e relativas de coprostanol. As amostras M3 e M4 apresentaram concentrações e perfis de distribuição de esteróis semelhantes, o que é compreensível uma vez que foram coletadas em áreas próximas. Tais resultados corroboram aqueles encontrados para a cafeína.

Dentre as amostras coletadas no igarapé do Mindu, apenas a amostra M5 apresentou o β -sistosterol como esteroide majoritário. No entanto, as concentrações de colesterol e coprostanol foram consideráveis, indicando que esse local ainda sofre bastante influência de contaminação. A amostra M5 apresentou concentração de coprostanol similar àquelas encontradas para as amostras M3 e M4, porém levemente menor. Assim, esse resultado não acompanhou a tendência observada para a cafeína, cuja concentração diminuiu de forma considerável na amostra M5. Essas diferenças podem ocorrer por diversos motivos, incluindo os diferentes particionamentos entre os compartimentos ambientais, labilidade e as diferentes composições dos efluentes lançados nos corpos aquáticos. Por exemplo, o coprostanol tem uma tendência muito maior

que a cafeína em adsorver em partículas de argilossilicatos. A cafeína, por sua vez, é muito mais lábil que os esteróis. Em relação ao lançamento de efluentes, eles podem representar desde todo o esgoto gerado no domicílio até as “águas servidas” que são provenientes de tanques, máquinas de lavar, pias de cozinhas, lavagem de veículos e calçadas, dentre outros usos. Nesse caso, somente os efluentes gerados pelo uso de sanitários são enviados à fossa séptica. Nesse sentido, podem surgir discrepâncias nas concentrações de coprostanol e cafeína. Vale ressaltar que todas as amostras de água coletadas no igarapé do Mindu apresentaram concentração de coprostanol muito acima do valor limite de 60 ng L⁻¹, sugerido por (COSTA; PESSOA; CARREIRA, 2018), assim como elevadas concentrações de cafeína.

Os índices diagnósticos foram determinados a fim de investigar a aplicabilidade em amostras de água. Na tabela 27 estão apresentados os índices para as amostras coletadas no igarapé do Mindu.

Tabela 27: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico nos igarapés do Mindu.

| | coprostanol/ (coprostanol+colestanol) | coprostanol/ colesterol | coprostanol/ epicoprostanol |
|----|--|------------------------------------|--|
| M1 | 0,95 | 2,86 | 20,55 |
| M2 | 0,97 | 2,86 | 34,27 |
| M3 | 0,96 | 1,67 | 21,70 |
| M4 | 0,96 | 1,36 | 19,36 |
| M5 | 0,96 | 1,06 | 16,26 |

Todas as amostras de água do igarapé do Mindu apresentaram o índice coprostanol/(coprostanol + colestanol) maior que 0,7, indicando contaminação acentuada por MO fecal. Similarmente, o índice coprostanol/colesterol foi maior que 1,0 para todas as amostras, reiterando a origem antropogênica. O índice epicoprostanol/coprostanol foi muito superior que 1,5 para todas as amostras, indicando a entrada de esgoto predominantemente não tratado.

Os índices diagnósticos listados acima corroboram as altas concentrações absolutas e relativas de coprostanol encontradas para as amostras de água coletadas no igarapé do Mindu.

5.7. Rio Negro

5.7.1. Cafeína

As amostras de água foram coletadas na orla de Manaus ao longo de cerca de 33 km (do NR1 ao NR15). As amostras coletadas no Rio Negro ao longo de toda a orla de Manaus abrangem as zonas Oeste, Sul e Leste, ou seja, toda a porção urbana do município, incluindo a foz dos igarapés Tarumã-Açu, Mindu e Quarenta. A tabela 28 apresenta as concentrações de cafeína para quinze amostras de água coletadas no Rio Negro.

Tabela 28: Concentrações de cafeína (ng L^{-1}) em amostras de água coletadas no Rio Negro.

| Amostra | Concentração (ng L^{-1}) |
|---------|-------------------------------------|
| NR1 | 53,15 |
| NR2 | 43,13 |
| NR3 | 20,59 |
| NR4 | 22,36 |
| NR5 | 20,21 |
| NR6 | 873,59 |
| NR7 | 397,56 |
| NR8 | 632,15 |
| NR9 | 68,00 |
| NR10 | 53,35 |
| NR11 | 87,15 |
| NR12 | 59,03 |
| NR13 | 24,22 |
| NR14 | 67,40 |
| NR15 | 216,85 |

As concentrações de cafeína para as amostras de água coletadas no Rio Negro variaram de 20,21 a 873,59 ng L^{-1} . Essa ampla variação é decorrente das características distintas dos pontos de coleta. A amostra NR1 foi coletada na praia da Ponta Negra, frequentado por muitos banhistas. É uma área nobre da cidade com predominância de condomínios de alto padrão, os quais possuem estações de tratamento de esgoto. As amostras NR2 e NR3 foram coletadas nas proximidades de vários estaleiros e pequenos portos privados. A amostra NR4 foi coletada nas proximidades do Complexo da Ponta do Ismael da empresa “Águas de Manaus”, responsável pela captação, tratamento e distribuição de água em Manaus. Nesse ponto, a concentração de cafeína foi uma das menores

observadas neste estudo. A amostra NR5 foi coletada próxima ao porto do São Raimundo, sendo a última amostra antes do desague de um igarapé urbano.

Um aumento considerável na concentração de cafeína foi observado para a amostra NR6, sendo mantido em um patamar elevado também para as amostras NR7 e NR8. As maiores concentrações de cafeína foram encontradas para as amostras NR6 e NR8, as quais foram coletadas próximo a foz dos igarapés do Mindu e Quarenta, respectivamente. Comparativamente, as amostras NR6 e NR8 apresentaram concentrações de cafeína cerca de quarenta e trinta vezes maiores que as amostras de menor concentração, respectivamente. A amostra NR7, coletada nas proximidades do porto de Manaus e entre a foz dos igarapés do Mindu e Quarenta, apresentou uma concentração de cafeína de intermediária àquelas das amostras NR6 e NR8. A amostra NR7 foi coletada a cerca de 1,43 km da amostra NR6, o suficiente para diminuir a concentração de cafeína em mais da metade. Similarmente, a amostra NR9 foi coletada a 3,0 km da amostra NR8, o suficiente para diminuir a concentração de cafeína cerca de dez vezes. Esses resultados mostram a alta capacidade de diluição do Rio Negro.

As amostras de NR9 a NR13 foram coletadas nas proximidades da região portuária, porém as concentrações de cafeína não foram altas. As amostras NR14 e NR15 foram coletadas no lago do Aleixo (parte do Rio Negro) próximo aos bairros Colônia Antônio Aleixo e Puraquequara. Um outro ponto importante a ser destacado é a elevação da concentração de cafeína observada para a amostra NR15, que foi coletada região de desague de dois igarapés que cortam os bairros Colônia Antônio Aleixo e Puraquequara. Tais regiões periféricas de Manaus foram ocupadas recentemente e de forma irregular. O aumento considerável da concentração de cafeína mostra que mesmo áreas em estágio recente de ocupação representam potenciais fontes de efluentes domésticos contendo indicadores de contaminação.

5.7.2. Hormônios esteroidais

A tabela 29 apresenta as concentrações dos hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do Rio Negro.

Tabela 29: Concentrações dos hormônios esteroidais (ng L⁻¹) em amostras de água coletadas no Rio Negro.

| Compostos | Concentração (ng L ⁻¹) | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|------|------|------|------|--------------|--------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | NR1 | NR2 | NR3 | NR4 | NR5 | NR6 | NR7 | NR8 | NR9 | NR10 | NR11 | NR12 | NR13 | NR14 | NR15 |
| Estrona | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 21,86 | 15,71 | 21,16 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| Estradiol | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 18,31 | <LOD | 19,79 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| Estriol | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| 17 α -etinilestradiol | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| Progesterona | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |

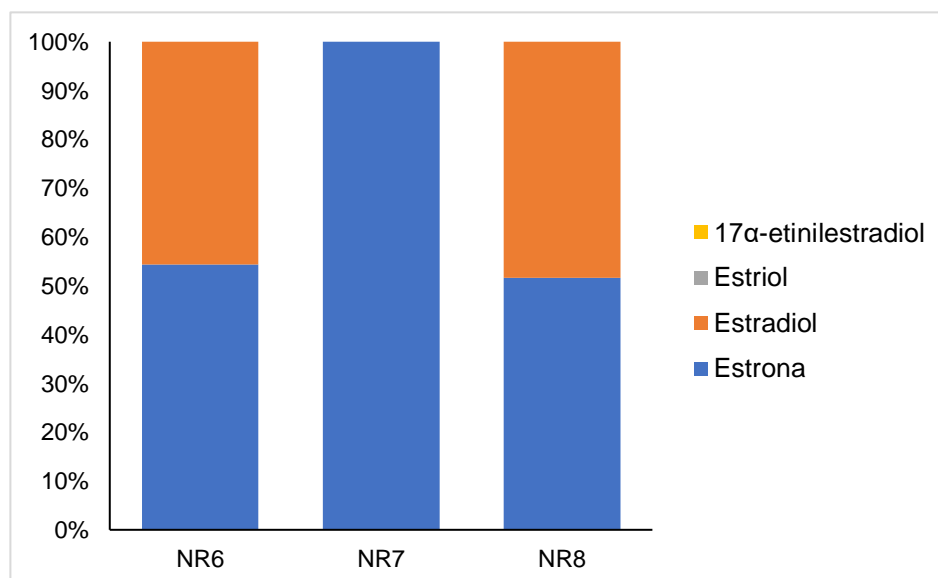
Somente nas amostras NR6, NR7 e NR8 foi possível detectar parte dos hormônios. Sendo que nas amostras NR6 e NR8 foram detectados os hormônios estrona e estradiol e na NR7 somente a estrona.

Uma possível explicação do motivo da maioria das amostras apresentarem as concentrações de hormônios <LOD, é a de que não há fontes significativas próximo a esses locais, associadas ao volume de água do Rio Negro.

Como mencionado anteriormente, as amostras NR6 e RN8 foram coletadas no Rio Negro próximo a foz dos igarapés do Mindu e Quarenta, respectivamente e a amostra NR7, coletada nas proximidades do porto de Manaus e entre a foz dos igarapés do Mindu e Quarenta. As concentrações ficaram na mesma ordem de grandeza, com pouca variação.

No gráfico 10, mostra o perfil de distribuição dos hormônios através de suas percentagens relativas nas amostras de água coletadas no Rio Negro.

Gráfico 10: Perfil de distribuição de hormônios esteroidais analisados neste estudo para as amostras do Rio Negro.



Como podemos ver no gráfico acima, NR6 e NR8 apresentam um perfil de distribuição semelhante. Na amostra NR7, em que somente a estrona foi detectada, representando 100 % dos hormônios detectados para este ponto.

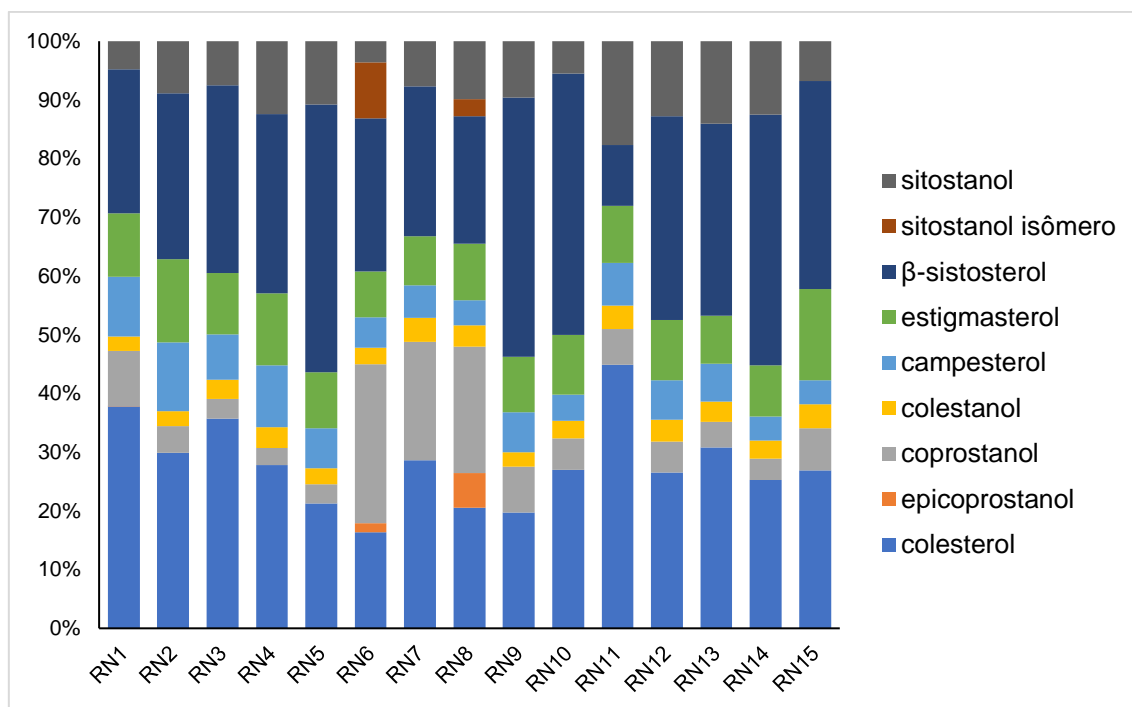
5.7.3. Esteróis

A tabela 30 apresenta as concentrações individuais de cada esteroide e o gráfico 11 mostra suas percentagens relativas nas amostras de águas coletadas no Rio Negro.

Tabela 30: Concentrações de esteróis (ng L⁻¹) nas amostras de água coletadas no Rio Negro.

| Amostras | Concentração (ng L ⁻¹) | | | | | | | | | |
|----------|------------------------------------|----------------|-------------|------------|-------------|---------------|---------------------|----------------------|------------|---------|
| | colesterol | epicoprostanol | coprostanol | colestanol | campesterol | estigmasterol | β -sitosterol | sitostanol (isômero) | sitostanol | total |
| RN1 | 564,96 | 0,66 | 141,64 | 36,63 | 151,80 | 161,27 | 366,43 | < LOD | 72,16 | 1495,54 |
| RN2 | 386,36 | < LOD | 58,12 | 32,85 | 152,40 | 182,91 | 365,02 | < LOD | 114,39 | 1292,04 |
| RN3 | 355,96 | < LOD | 33,05 | 32,75 | 77,16 | 103,94 | 318,23 | < LOD | 74,71 | 995,80 |
| RN4 | 300,15 | < LOD | 31,72 | 38,33 | 113,82 | 132,99 | 330,20 | < LOD | 133,71 | 1080,93 |
| RN5 | 279,15 | < LOD | 42,60 | 35,31 | 89,09 | 124,81 | 598,10 | < LOD | 140,90 | 1309,97 |
| RN6 | 427,90 | 40,93 | 706,46 | 72,28 | 135,87 | 205,57 | 681,18 | 247,40 | 94,76 | 2612,35 |
| RN7 | 307,90 | < LOD | 217,55 | 43,57 | 59,25 | 90,46 | 274,41 | < LOD | 82,77 | 1075,92 |
| RN8 | 296,25 | 85,06 | 309,54 | 52,21 | 62,29 | 138,18 | 312,77 | 42,13 | 141,88 | 1440,31 |
| RN9 | 257,48 | < LOD | 101,57 | 32,14 | 88,74 | 122,04 | 575,30 | < LOD | 125,40 | 1302,67 |
| RN10 | 316,19 | < LOD | 62,58 | 34,94 | 52,73 | 118,47 | 522,11 | < LOD | 64,41 | 1171,43 |
| RN11 | 333,01 | < LOD | 45,29 | 29,61 | 53,76 | 72,29 | 76,94 | < LOD | 131,16 | 742,06 |
| RN12 | 319,19 | < LOD | 64,28 | 44,12 | 81,50 | 123,90 | 417,90 | < LOD | 153,85 | 1204,74 |
| RN13 | 381,79 | < LOD | 53,75 | 43,72 | 80,02 | 100,43 | 406,08 | < LOD | 174,00 | 1239,78 |
| RN14 | 257,49 | < LOD | 36,44 | 31,43 | 42,12 | 88,58 | 435,06 | < LOD | 127,34 | 1018,47 |
| RN15 | 276,27 | < LOD | 73,26 | 42,33 | 41,77 | 159,48 | 363,16 | < LOD | 69,94 | 1026,21 |

Gráfico 11: Proporção relativa de esteróis das amostras do Rio Negro.



As amostras coletadas no Rio Negro apresentaram concentrações totais de esteróis entre 742,05 e 2612,35 ng L⁻¹, enquanto a concentração de coprostanol variou de 31,72 a 706,46 ng L⁻¹. Assim, o coprostanol representou de 2,93 a 27,04% do conteúdo total de esteróis.

As amostras de RN1 a RN5 predominam de colesterol e β-sitosterol. Dentre as amostras coletadas na orla do Rio Negro que correspondem à zona oeste de Manaus, RN1 foi a que apresentou a maior concentração de coprostanol. Nessa amostra também foi encontrado o epicoprostanol (característico de esgoto tratado). A amostra RN4 apresentou a menor concentração de coprostanol. Vale ressaltar que nesse local é feita a captação de água do Rio Negro para tratamento e distribuição à população.

As maiores concentrações totais de esteróis, assim como as maiores concentrações absolutas e relativas de coprostanol, foram encontradas nas amostras RN6 e RN8 (coletadas na foz dos igarapés do Mindu e do Quarenta, respectivamente). Além disso, tais amostras também apresentaram o composto epicoprostanol (que pode ser formado durante o processo de tratamento de esgoto).

Na microbacia do São Raimundo, nas proximidades do ponto de coleta da amostra RN8, foi inaugurada a maior estação de tratamento de esgoto do norte

do país, com capacidade para tratar até 300 litros por segundo. Segundo o governo do estado do Amazonas, a estação é parte do sistema de esgotamento sanitário de um programa municipal de desenvolvimento social. A obra envolveu a construção de 31 quilômetros de redes de coleta e seis estações elevatórias que foram construídas nos bairros do Santo Antônio, São Raimundo, Glória, Aparecida, Presidente Vargas e Centro. A estimativa é que a estação irá beneficiar cerca de 192 mil pessoas.

As amostras coletadas após a foz do igarapé do Quarenta, de RN9 a RN11, apresentaram sucessivos decréscimos da concentração de coprostanol em relação à amostra RN8. Esse resultado é bastante interessante e revela a grande capacidade do Rio Negro em depurar a carga orgânica aportada.

Na orla do Rio Negro que corresponde à zona leste da cidade, estão os pontos de RN12 a RN15. As concentrações de esteróis totais variaram pouco para tais amostras, sendo β -sitosterol foi o esteroide majoritário. O coprostanol foi encontrado em todas as amostras coletadas na orla da zona leste de Manaus.

Com base na concentração limiar de 60 ng L^{-1} para o coprostanol, sugerida por Costa, Pessoa e Carreira, 2018, oito das quinze amostras coletadas no Rio Negro seriam classificadas como contaminadas. Dentre essas oito amostras, aquelas coletadas nas proximidades da foz dos igarapés do Mindu e do Quarenta, juntamente com a amostra coletada na Praia da Ponta Negra, foram as que apresentaram os maiores graus de contaminação.

Os índices diagnósticos foram determinados a fim de investigar a aplicabilidade em amostras de água. Na tabela 31 estão apresentados os índices para as amostras coletadas no Rio Negro.

Tabela 31: Razões diagnósticas para identificar possível contaminação por esgoto doméstico no Rio Negro.

| | coprostanol/ (coprostanol+colestanol) | coprostanol/ colesterol | coprostanol/ epicoprostanol |
|------|--|------------------------------------|--|
| RN1 | 0,79 | 0,25 | 214,91 |
| RN2 | 0,63 | 0,15 | - |
| RN3 | 0,50 | 0,09 | - |
| RN4 | 0,45 | 0,10 | - |
| RN5 | 0,54 | 0,15 | - |
| RN6 | 0,90 | 1,65 | 17,25 |
| RN7 | 0,83 | 0,70 | - |
| RN8 | 0,85 | 1,04 | 3,63 |
| RN9 | 0,75 | 0,39 | - |
| RN10 | 0,64 | 0,19 | - |
| RN11 | 0,60 | 0,13 | - |
| RN12 | 0,59 | 0,20 | - |
| RN13 | 0,55 | 0,14 | - |
| RN14 | 0,53 | 0,14 | - |
| RN15 | 0,63 | 0,26 | - |

Dentre as quinze amostras coletadas no Rio Negro, aquelas sob influência da foz dos igarapés do Mindu e do Quarenta apresentaram os maiores valores para os índices coprostanol/(coprostanol + colestanol) e coprostanol/colesterol. Esse resultado corrobora a indicação de contaminação baseada na concentração absoluta de coprostanol. As demais amostras consideradas contaminadas pela concentração absoluta, RN1 e RN15, apresentaram valores aumentados para as razões diagnósticas. A amostra RN1 apresentou valores para ambas as razões indicativos de contaminação, enquanto a amostra RN15 apresentou valor indicativo de contaminação apenas para a razão coprostanol/colesterol.

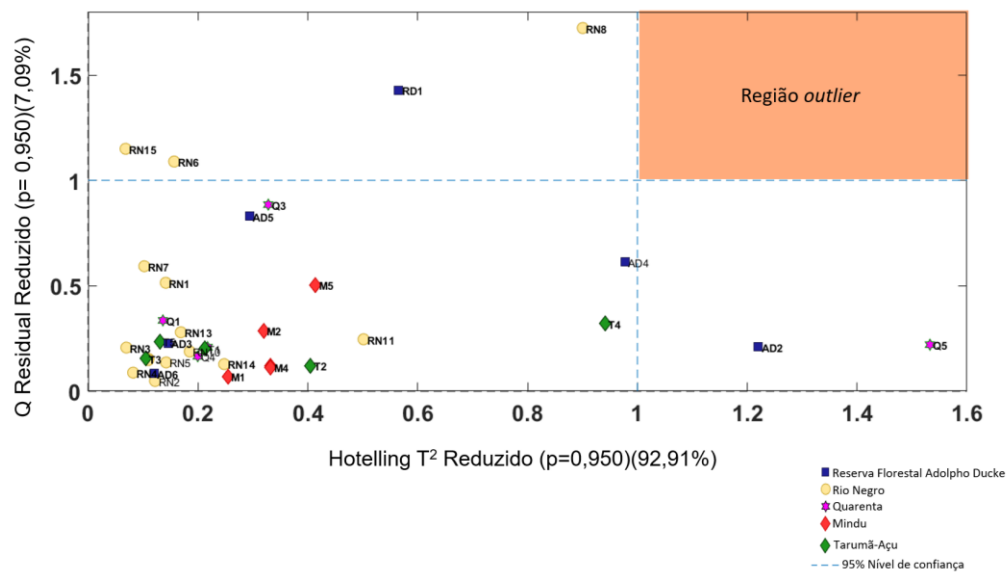
O índice epicoprostanol/coprostanol só foi calculado para três amostras, pois as demais não apresentaram concentrações detectáveis de epicoprostanol. Quando calculado, o índice epicoprostanol/coprostanol apresentou valores muito superiores a 1,5, indicando o predomínio de esgoto não tratado.

5.8. Tratamento Estatístico das amostras

O gráfico 12 apresenta o gráfico do teste T^2 de Hotelling/Q-residual. Podemos ver que não há nenhum ponto anômalo, pois nenhum dos pontos

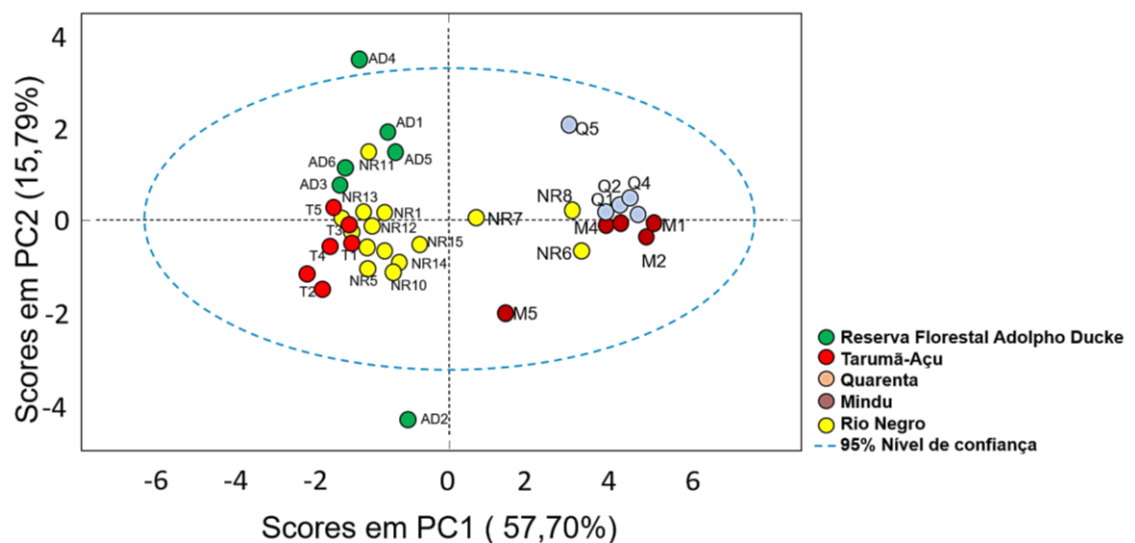
aparece na região de *Outlier*. Com isso não foi necessário o descarte de amostras no tratamento estatístico dos dados.

Gráfico 12: Teste T^2 de Hotelling/Q-residual para todas as amostras deste estudo.



Abaixo está o gráfico PCA (PC1/PC2), cuja a variância acumulada nos dois primeiros componentes principais é de 73,49%. Este valor percentual indica que o gráfico PCA explica 73,49% dos dados apresentados.

Gráfico 13: PCA das amostras para dois primeiros componentes principais.



O PC1 contribuiu em maior grau (57,50%) no agrupamento das amostras de acordo com seu grau de contaminação dos corpos hídricos.

A predominância dos compostos de origem antropogênica sobre os esteróis biogênicos foi responsável por agrupar as amostras M1-4 e Q1-4 em a região mais positiva de PC1. As amostras M5 e Q5 ficaram um pouco distantes de seus grupos devido às menores concentrações de compostos antrópicos causadas pelo efeito de diluição.

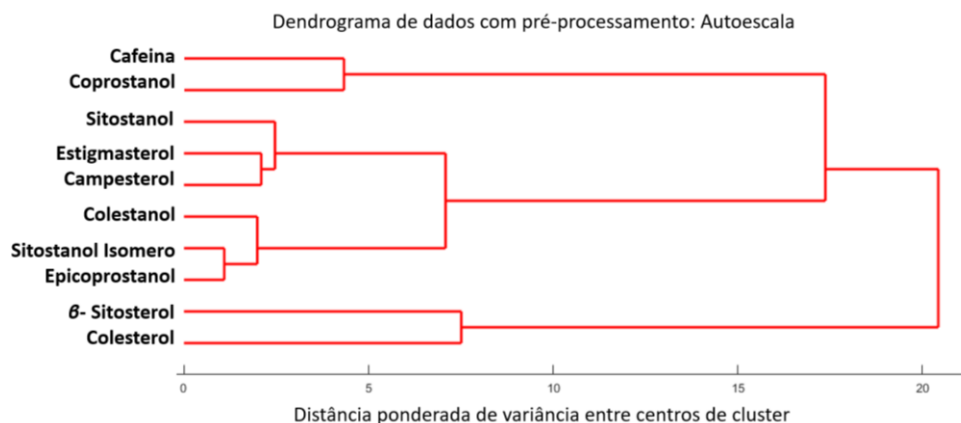
As amostras NR6, RN7 e NR8 também estão na região positiva de PC1, devido a influência dos igarapés do Quarenta e Mindu nas proximidades

Na região negativa de PC1, observam-se todas as outras amostras do Rio Negro. Essas amostras de Rio Negro são diferentes de NR6, NR7 e RN8 porque tinham concentrações muito mais baixas de compostos de origem antropogênica e uma predominância de esteróis biogênicos. Da mesma forma, as amostras do igarapé Tarumã-Açu e dos igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke distribuíram-se na região negativa do PC1 devido às suas menores concentrações de indicadores antrópicos.

O PC2 contribuiu com uma variância de apenas 15,79%, agrupando amostras com base em diferenças na contribuição de alguns esteróis biogênicos, como colesterol e colestanol na região positiva e β -sitosterol na região negativa. As amostras da Reserva Florestal Adolpho Ducke apresentaram maior contribuição de esteróis aquáticos (colesterol e colestanol). Em contraste, as amostras do Rio Negro e do igarapé do Tarumã-Açu apresentaram maior contribuição de um esteroide vegetal (β -sitosterol).

Na HCA da similaridade em relação a cafeína e esteróis, é possível observar a formação de 3 grupos, conforme mostrado no gráfico 14. No grupo 1 temos a cafeína e o coprostanol, no grupo 2 temos o sitostanol, estigmasterol, campesterol, colestanol, sitostanol isômero e o epicoprostanol, e no grupo 3 temos o β -sitosterol e colesterol.

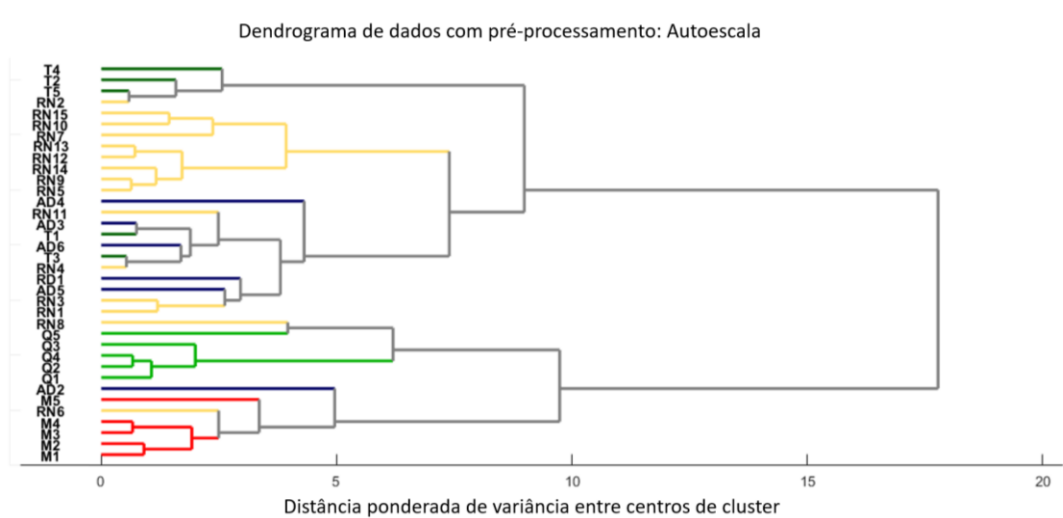
Gráfico 14: Dendrograma HCA da relação de similaridade entre os compostos determinados neste estudo.



A formação desse grupo tem por característica o agrupamento por similaridade dos compostos segundo sua concentração relativa no corpo aquático. No grupo 1 temos os principais marcadores antropogênicos, mostrando que a cafeína e o coprostanol possuem maior similaridade em relação aos outros compostos. No grupo 2 apresentam esteróis biogênicos menos expressivos e o epicoprostanol, que é considerado um marcador antropogênico, porém em menores concentrações. A HCA nos mostra que as concentrações de epicoprostanol são da mesma ordem que as concentrações de outros esteróis biogênicos, indicando que a matéria orgânica descartada nesses corpos aquáticos não recebe qualquer tipo de tratamento. No grupo 3 temos os dois esteróis biogênicos mais expressivos encontrados neste estudo, o β -sitosterol, marcador característicos de plantas terrestres e o colesterol marcador natural associados a microrganismos aquáticos.

No gráfico 15, podemos observar a HCA referente a comparação entre as similaridades das amostras.

Gráfico15: Dendrograma HCA da relação de similaridade as amostras deste estudo.



Como a HCA observa a similaridade das amostras, é possível utilizar essa similaridade dentro dos grupos conforme vimos na PCA. Podemos observar que as amostras do Mindu e Quarenta formam grupos bem definidos, incluindo os pontos RN6 e RN8 (foz do Mindu e Quarenta respectivamente). A amostra AD2, apresentou um alto nível de β -sitosterol, e por isso está no grupo dos pontos do Mindu, nesse sentido há uma similaridade ao M5, na qual o β -sitosterol também foi o esteroide majoritário. Dentro do conjunto estatístico, as demais amostras pertencem a um mesmo grande grupo.

5.9. Comparativo entre os corpos hídricos deste estudo

Na figura 25, vemos um gráfico de “bolhas” mostrando de forma comparativa as concentrações de cafeína, hormônios esteroidais e coprostanol nos igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Tarumã-Açu, Quarenta, Mindu e no Rio Negro.

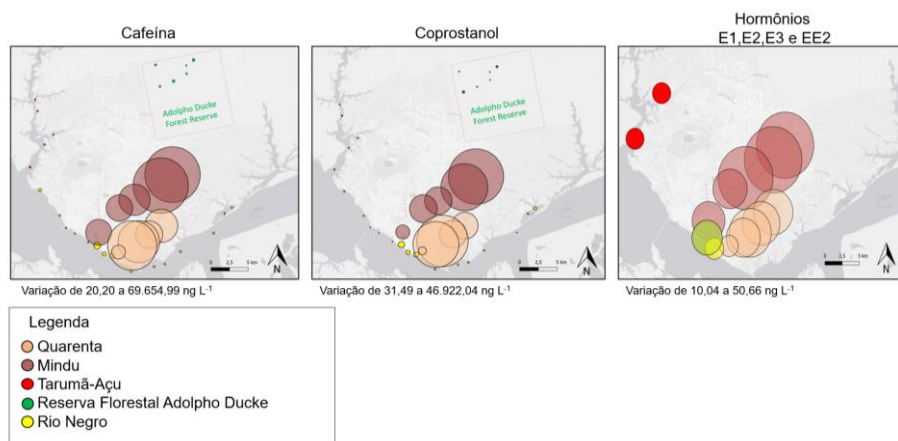


Figura 25: Gráfico de “bolhas” comparando as concentrações de cafeína, hormônios e coprostanol (ng L⁻¹) em todos os corpos aquáticos estudados.

Como esperado, os contaminantes apresentaram maior incidência na área urbana em relação as áreas semiurbanas e preservadas. A cafeína e o coprostanol, apesar de terem sido detectados na Reserva Adolpho Ducke, as suas concentrações são distintamente inferiores aos do Quarenta e Mindu, sendo comparáveis aos níveis encontrados no Tarumã-Açu e na maioria das amostras do Rio Negro.

A presença dos hormônios evidencia pontos onde há contaminação. Levando isso em consideração, de modo geral, podemos classificar os corpos aquáticos aqui estudados de acordo com seu aspecto da área de coleta, volume de água e contaminação, de modo a resumir na tabela 32:

Tabela 32: Classificação dos corpos aquáticos deste estudo.

| Amostras | Aspecto da área de coleta | Volume de água | Contaminação |
|---------------|---------------------------|----------------|-----------------|
| Reserva Ducke | Preservado | pequeno | Não contaminado |
| Tarumã-Açu | Semiurbano | Médio | Pequena |
| Quarenta | Urbano | pequeno | Grande |
| Mindu | Urbano | pequeno | Grande |
| Rio Negro | Urbano | Grande | pequena/média |

Apesar dos igarapés da Reserva Adolpho Ducke e Tarumã-Açu apresentarem concentrações de mesma grandeza de cafeína e coprostanol, se diferem quanto ao seu aspecto da área de coleta e volume de água, sendo que para a Reserva Adolpho Ducke, esses compostos não são de origem antrópica

e para as do Tarumã-Açu, há uma possibilidade desses compostos serem antropogênicos, pois abrange uma área semiurbana e foram detectadas concentrações do hormônio estrona, sendo aqui classificado como um corpo aquático de grau contaminação pequena. O Quarenta e o Mindu possuem as mesmas classificações, se assemelham em relação aos aspectos da área urbana de coleta, volume de água (porte) e altas concentrações de cafeína esteróis e detecção de hormônios em todos os pontos. O grau de contaminação do Rio Negro na região de Manaus, foi classificado como pequena/média pois em algumas áreas, as concentrações de contaminantes variaram de forma considerável com níveis iguais ou maiores aos da reserva e Tarumã-Açu e menores que os igarapés do Quarenta e Mindu.

5.9.1. Comparação das concentrações de cafeína, hormônios esteroidais e coprostanol com outros estudos no Brasil

As concentrações de cafeína, hormônios esteroidais e coprostanol determinadas neste estudo estão na mesma ordem de grandeza para a maioria dos estudos repostados no Brasil. A comparação das concentrações dos compostos encontradas nas amostras de água desse estudo com as reportadas em alguns estudos no Brasil é apresentada na tabela 33.

Tabela 33: Comparação das concentrações de cafeína, hormônios (E1, E2, E3 e EE2) e coprostanol em águas superficiais no Brasil.

| Local | Cafeína (ng L ⁻¹) | Hormônios (ng L ⁻¹) | Coprostanol (ng L ⁻¹) | Referência |
|-------------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------|
| Baía de Guanabara (RJ) | 60000 - 377000 | | | Ferreira (2005) |
| Bacia do Atibaia (SP) | 170 – 127090 | | | Montagner & Jardim (2011) |
| Rio dos Sinos (RS) | 41,67 – 6195,38 | | | Petteffi et al. (2018) |
| Baía de Guanabara (RJ) | | | 30 – 206000 | Costa, Pessoa e Carreira (2018) |
| Baía de Guaratuba (Brasil) | | | 1000 – 2230 | CABRAL et al. (2018) |
| Bacia do alto Iguaçu (PR) | 70 – 59810 | | | IDE et al. (2019) |
| Rio Negro (AM) | 15 – 45 | | | Rico et al. (2021) |
| Igarapés de Manaus (AM) | 7033 – 12237 | E1: 20-70; E2: 41 - 166 | | Rico et al. (2021) |
| Rio Amazonas (AM) | 14 – 61 | | | Rico et al. (2021) |
| Rio Amazonas (PA) | 49 – 573 | | | Rico et al. (2021) |
| Igarapés de Santarém (PA) | 185 – 3.289 | E1: <LOD – 3,0 | | Rico et al. (2021) |
| Rio Tapajós (PA) | 158 – 153 | | | Rico et al. (2021) |
| Igarapés de Macapá (AP) | 2004 – 7249 | E1: 7,3 – 56; E3: 13 – 81 | | Rico et al. (2021) |
| Rio Tocantins (PA) | 61 – 133 | E1: <LOD - 0,9 | | Rico et al. (2021) |
| Igarapés de Belém (PA) | 284 – 10265 | E1; 3,0 – 82; E3: <LOD – 102 | | Rico et al. (2021) |
| Reserva Adolpho Ducke | 31,49 – 120,44 | | 20,2 – 165,8 | Presente estudo |
| Igarapé do Tarumã-Açu, | 31,65 – 59,58 | E1: <LOD - 14,89 | 26,6 – 42,0 | Presente estudo |
| Igarapé do Quarenta | 2878,73 – 36934,25 | E1: 15,44-37,97; E2: <LOD - 19,03; E3: <LOD -15,94; EE2: <LOD - 17,40 | 1466,7 – 60082,0 | Presente estudo |
| Igarapé do Mindu | 10231,71-46922,03 | E1: 18,85 - 50,66, E2: 15,60 - 44,83, E3: 14,25 - 32,71, EE2: <LOD – 23,40 | 4490,5 – 69655,0 | Presente estudo |
| Rio Negro | 31,72 – 706,45 | E1: LOD- 21,85; E2: <LOD – 19,79 | 20,2 – 873,6 | Presente estudo |

As maiores concentrações de cafeína encontradas em corpos hídricos brasileiros foram na baía de Guanabara no estado do Rio de Janeiro (357000 ng L⁻¹) e em um rio da bacia do Atibaia (São Paulo) (127090 ng L⁻¹), enquanto que a maior concentração de cafeína deste estudo foi de 69655,0 ng L⁻¹ no igarapé do Mindu. As concentrações de cafeínas para os igarapés do Quarenta e Mindu do presente trabalho, são comparáveis aos encontrados no Rio Sinos (RS) e nos rios da bacia do alto Iguaçu (PR), na qual ambos foram coletados em áreas urbanas.

Rico et al., (2021), estudou os igarapés da cidade de Manaus, e parte do Rio Negro, além dos igarapés das principais cidades do Norte do país bem como seus principais afluentes em pontos coletados fora da zona urbana. O estudo mostra que as concentrações dos rios Amazonas, Tapajós e Tocantins, estão em níveis relativamente baixos e são comparáveis aos encontrados neste estudo, na Reserva Adolpho Ducke, Tarumã-Açu e parte do Rio Negro. Os igarapés das cidades de Belém, Santarém e Macapá apresentaram altos níveis de cafeína, no entanto bem inferiores aos encontrados neste estudo para uma área urbana.

Ainda neste estudo, Rico et al., também determinou as concentrações de outros hormônios esteroidais, dentre eles a estrona (E1) e estriol (E3) onde E1 variou de 3,0 a 82 ng L⁻¹ e o E3 variou de 13 a 166 ng L⁻¹ nas diferentes amostras. As maiores concentrações de hormônios foram detectadas em igarapés inseridas na malha urbana das capitais Belém, Macapá e Manaus, bem como observados neste estudo.

A maior concentração de coprostanol (MOP) encontradas em corpos hídricos foi na baía de Guanabara no estado do Rio de Janeiro (206000 ng L⁻¹), enquanto que a maior concentração de coprostanol deste estudo foi de 46922,03 ng L⁻¹ no igarapé do Mindu.

Os rios da baía de Guanabara e Guaratuba, apresentaram concentrações elevadas de coprostanol, bem como as encontradas nos igarapés urbanos deste estudo.

5.10. Proposta de um novo índice diagnóstico

Com base nas concentrações determinadas, na análise estatística e nas características dos locais de coleta das amostras, a seguinte equação foi

proposta para o cálculo de um índice diagnóstico de águas superficiais na região amazônica:

$$\text{Índice} = \sqrt{\frac{\text{caf} \cdot \text{cop}}{(\text{col} + \beta\text{sit})^2}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde, caf: concentração de cafeína; cop: concentração de coprostanol; col: concentração de colesterol e β sit: concentração de β -sitosterol.

Este índice proposto leva em consideração a razão das contribuições dos principais marcadores antropogênicos (cafeína, coprostanol) e os dois principais biogênicos (colesterol, e β -sitosterol) deste estudo. Como a cafeína e o coprostanol são proporcionais (estatisticamente covariam), eles se multiplicam na equação. No denominador temos a soma do colesterol e β -sitosterol. O colesterol, associado a microrganismos aquáticos, e β -sitosterol, associado a plantas terrestres, e a soma do denominador é elevada ao quadrado para que as unidades (ng L^{-1}) sejam canceladas. A raiz quadrada da razão é usada somente para condensar os valores. Com isso podemos ter a seguinte classificação baseada no índice (tabela 34):

Tabela 34: Classificação com base nos índices proposto pela equação 1.

| Índice | Classificação |
|---------------|---|
| 0,0 | Água não contaminada |
| >0,0 e <0,08 | Característica de ambiente preservado, maior contribuição biogênica. |
| >0,08 e < 0,5 | Incerteza, sendo sua interpretação dependendo características do local, porém predominância MO biogênica. |
| >0,5 e <1 | Característico de ambientes contaminados, com predominância de MO biogênica. |
| >1 | Ambiente altamente contaminado com predominância de MO antropogênica. |

Aplicando o índice diagnóstico proposto (tabela 35), nas amostras desde estudo temos:

Tabela 35: Aplicação do índice diagnóstico proposto para as amostras deste trabalho.

| Amostra | $\sqrt{\frac{caf \cdot cop}{(col + \beta sit)^2}}$ | Classificação |
|---------|--|--|
| AD1 | 0,08 | Características de ambiente preservado |
| AD2 | 0,003 | Características de ambiente preservado |
| AD3 | 0,04 | Características de ambiente preservado |
| AD4 | 0,14* | Incerteza, com maior contribuição de MO biogênica |
| AD5 | 0,14* | Incerteza, com maior contribuição de MO biogênica |
| AD6 | 0,05 | Características de ambiente preservado |
| T1 | 0,04 | Características de ambiente preservado |
| T2 | 0,04 | Características de ambiente preservado |
| T3 | 0,06 | Características de ambiente preservado |
| T4 | 0,04 | Características de ambiente preservado |
| T5 | 0,05 | Características de ambiente preservado |
| NR1 | 0,09** | Incerteza, com maior contribuição de MO biogênica |
| NR2 | 0,07 | Características de ambiente preservado |
| NR3 | 0,04 | Características de ambiente preservado |
| NR4 | 0,04 | Características de ambiente preservado |
| NR5 | 0,03 | Características de ambiente preservado |
| NR6 | 0,71 | Ambiente contaminado, com maior contribuição de MO biogênica |
| NR7 | 0,51 | Ambiente contaminado, com maior contribuição de MO biogênica |
| NR8 | 0,73 | Ambiente contaminado, com maior contribuição de MO biogênica |
| NR9 | 0,10** | Incerteza, com maior contribuição de MO biogênica |
| NR10 | 0,07 | Características de ambiente preservado |
| NR11 | 0,15** | Incerteza, com maior contribuição de MO biogênica |
| NR12 | 0,08 | Características de ambiente preservado |
| NR13 | 0,05 | Características de ambiente preservado |
| NR14 | 0,07 | Características de ambiente preservado |
| NR15 | 0,20** | Incerteza, com maior contribuição de MO biogênica |
| M1 | 2,77 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| M2 | 2,02 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| M3 | 1,46 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| M4 | 1,46 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| M5 | 0,18** | Incerteza, com maior contribuição de MO biogênica |
| Q1 | 1,53 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| Q2 | 2,65 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| Q3 | 2,89 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| Q4 | 1,80 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |
| Q5 | 1,23 | Ambiente altamente contaminado, maior contribuição de MO antropogênica |

* possivelmente não contaminado, ** possivelmente contaminado.

O valor limite menor que 0,08 foi baseado no ponto AD1, que é o ponto mais distante coletado na Reserva Adolpho Ducke neste trabalho, e que apresentou maiores concentrações de cafeína e coprostanol, sendo

considerada aqui como a maior certeza de que é um ambiente preservado e assim tomado como referência de característica de ambiente preservada. O valor de limite 0,5 foi tomado como referência de índice de contaminação baseada na amostra NR7 (coletada no Porto de Manaus), sendo encontrada nesta amostra as menores concentrações de cafeína e coprostanol, dentre as amostras consideradas como contaminadas. O valor limite de 1, foi considerado baseado na amostra Q5 que dentre as amostras que apresentaram maior contribuição antropogênica foi a que apresentou a menor concentração de cafeína e coprostanol.

Na tabela 36 podemos observar o comparativo de alguns índices diagnósticos encontrado na literatura, cujo os mesmo já foram citados anteriormente e com o índice diagnóstico proposto neste trabalho.

Tabela 36: Comparação com alguns índices diagnósticos

| Amostra | cop/cop+colestanol | cop/colesterol | cop/epicop | Esta proposta |
|----------------|--------------------|----------------|------------|---------------|
| AD1 | 0,57 | 0,11 | - | 0,08 |
| AD2 | 0,55 | 0,08 | - | 0,003 |
| AD3 | 0,54 | 0,10 | - | 0,04 |
| AD4 | 0,56 | 0,29 | - | 0,14 |
| AD5 | 0,50 | 0,13 | - | 0,14 |
| AD6 | 0,45 | 0,12 | - | 0,05 |
| T1 | 0,51 | 0,08 | - | 0,04 |
| T2 | 0,58 | 0,06 | - | 0,04 |
| T3 | 0,52 | 0,16 | - | 0,06 |
| T4 | 0,60 | 0,10 | - | 0,04 |
| T5 | 0,58 | 0,12 | - | 0,05 |
| NR1 | 0,79 | 0,251 | 214,912 | 0,09 |
| NR2 | 0,64 | 0,150 | - | 0,07 |
| NR3 | 0,50 | 0,093 | - | 0,04 |
| NR4 | 0,45 | 0,106 | - | 0,04 |
| NR5 | 0,55 | 0,153 | - | 0,03 |
| NR6 | 0,91 | 1,651 | 17,26 | 0,71 |
| NR7 | 0,83 | 0,707 | - | 0,51 |
| NR8 | 0,86 | 1,045 | 3,63 | 0,73 |
| NR9 | 0,76 | 0,394 | - | 0,10 |
| NR10 | 0,64 | 0,198 | - | 0,07 |
| NR11 | 0,60 | 0,136 | - | 0,15 |
| NR12 | 0,59 | 0,201 | - | 0,08 |
| NR13 | 0,55 | 0,141 | - | 0,05 |
| NR14 | 0,54 | 0,142 | - | 0,07 |
| NR15 | 0,63 | 0,265 | - | 0,20 |
| M1 | 0,96 | 2,87 | 20,56 | 2,77 |

| | | | | |
|----|------|------|-------|------|
| M2 | 0,98 | 2,87 | 34,27 | 2,02 |
| M3 | 0,97 | 1,68 | 21,70 | 1,46 |
| M4 | 0,96 | 1,36 | 19,37 | 1,46 |
| M5 | 0,96 | 1,07 | 16,26 | 0,18 |
| Q1 | 0,94 | 2,63 | 19,37 | 1,53 |
| Q2 | 0,93 | 2,52 | 19,09 | 2,65 |
| Q3 | 0,93 | 2,36 | 19,70 | 2,89 |
| Q4 | 0,93 | 1,98 | 16,75 | 1,80 |
| Q5 | 0,81 | 2,69 | 9,69 | 1,23 |

Os números em vermelho indicam valores de índices para possivelmente contaminado ou altamente contaminado.

Podemos notar uma concordância entre os índices encontrado na literatura com o proposto neste trabalho. Este índice pode ajudar a complementar os resultados além de fornecer uma alternativa para a avaliação de contribuição de matéria orgânica em amostras ambientais. Vale ressaltar que para a finalidade deste trabalho, o índice proposto corresponde as expectativas, e possivelmente pode ser estendido para outras regiões da Amazônia, porém para uma aplicação mais geral é necessário a verificação deste índice em outros ambientes aquáticos.

6. Conclusão

A partir da determinação dos analitos da MOD e MOP, que compõem a matriz aquosa, foram determinadas as concentrações de cafeína, hormônios esteroidais e esteróis, sendo que tanto a cafeína e hormônios foram determinados na MOD e os esteróis na MOP.

Os hormônios não ofereceram resultados interessantes a ponto de se conseguir utilizar para diferenciar a contaminação de corpos aquáticos. Já a cafeína e coprostanol apresentaram uma correlação, sendo potenciais indicadores de contaminação para a região.

Apesar dos inúmeros trabalhos ao redor do mundo, ainda não há um consenso em relação à concentração de cafeína, hormônios (E1, E2, E3 e EE2) e esteróis antropogênicos (coprostanol) em ambientes aquáticos. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), um dos órgãos responsáveis pela determinação de limites toleráveis de compostos químicos no ambiente, não especifica a quantidade aceitável desses compostos em corpos hídricos. No entanto, as concentrações extremamente altas encontradas em corpos aquáticos nas proximidades de grandes cidades indicam que a principal origem

é antropogênica. Além disso, a presença desses marcadores pode ser um indicativo de que outros contaminantes estão presentes, ainda que em níveis de traço, mas com consequências para o ambiente e para a saúde ainda não esclarecidas.

Através dos resultados aqui obtidos, notamos que as concentrações de cafeína e coprostanol são muito maiores nas amostras coletadas nos igarapés do Quarenta e Mindu. Não podemos afirmar com certeza, mas indícios mostram que o dentre os igarapés da área urbana de Manaus, o Mindu é o mais contaminado seguido do Quarenta. Por sua vez, as amostras coletadas nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke e Tarumã-Açu e Rio Negro apresentaram concentrações de cafeína e coprostanol menores. Os hormônios não foram detectados nas amostras da Reserva Adolpho Ducke e na maioria das amostras do Tarumã-Açu e Rio Negro. Tais discrepâncias podem ser associadas ao menos a dois fatores: I) diferenças na densidade populacional dos igarapés urbanos e II) volume e vazão dos corpos d'água.

Algumas amostras do Rio Negro se destacaram em relação ao aporte de MO fecal, dentre as quais estão aquelas coletadas nas proximidades da foz dos igarapés do Mindu e do Quarenta.

Apesar das amostras da Reserva Adolpho Ducke e as do Tarumã-Açu apresentarem concentrações de cafeína e coprostanol comparáveis, o aspecto da área de coleta e volume de água são diferentes, pois as concentrações de cafeína e coprostanol encontradas na Reserva Adolpho Ducke podem ser atribuídas a origem natural, pois não há indicativos de poluição/contaminação ou qualquer ação prejudicial ao meio ambiente no local. No entanto há uma necessidade de outras metodologias para explicar as concentrações de cafeína e coprostanol encontradas nas amostras da Reserva Ducke, a fim de determinar sua real fonte. Além do mais, o fato de os igarapés da reserva apresentarem um menor volume de água, contribui para o aumento significativo das concentrações, enquanto que as concentrações de cafeína e coprostanol do Tarumã-Açu sofre o efeito da diluição e depuração devido ao seu maior volume.

O índice diagnóstico proposto neste trabalho levou em consideração as concentrações dos marcadores antropogênicos (cafeína e coprostanol) e biogênicos (colesterol e β -sitosterol) determinados neste trabalho e fornece uma alternativa para a verificação de contribuição de MO orgânica em amostras de

águas superficiais de água doce. O índice mostrou concordância quando comparado a outros índices diagnósticos reportados na literatura.

Os resultados obtidos neste estudo forneceram informações úteis para acessar os níveis de marcadores antropogênicos e biogênicos nos igarapés do Quarenta, Mindu, Tarumã-Açu e Rio Negro, porém é necessário um estudo mais aprofundado de forma a assegurar os limites que possam representar concentrações naturais, pois como visto, as concentrações de cafeína e coprostanol foram consideráveis para uma área de preservação ambiental neste estudo.

7. Referências bibliográficas

ABREU-MOTA, M. et al. Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. **Chemosphere**. 2013.

ALBUQUERQUE, A. R. C. **Bacia hidrográfica: unidade de planejamento ambiental**. REVISTA GEONORTE, Edição Especial, 4(4). 201-209. 2012.

ALHO, C. J. R. et al. Amazonian freshwater habitats experiencing environmental and socioeconomic threats affecting subsistence fisheries. **Ambio** 44. 412-425. 2015.

ANDRADE, R. V.; LORA, E. E. S.; DUPAS., F. A. Recursos naturais, demografia e desenvolvimento: uma análise baseada no relatório de desenvolvimento humano 2001 da ONU. **Enc. Energ. Meio Rural**.4. 2002.

ANDRÁSI, N. et al. Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry, **Talanta**. 115. 367-373. 2013.

ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução - RE nº 162, de 11 de setembro de 2001.

ARAÚJO, M. P. et al. Fecal sterols as sewage contamination indicators in Brazilian mangroves. **Marine Pollution Bulletin**. 165. 2021.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. **The Science of the Total Environment**. 333(3). 167-84. 2004.

AWAD, H. KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. **Applied Spectroscopy Reviews**. 50. 158-175. 2015.

AZHAR, S. C., et al. Classification of River Water Quality Using Multivariate Analysis. **Procedia Environ. Sci**. 30. 79 - 84. 2015 .

BALMER, M. E. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. **Environmental Science & Technology**. 39(4). 953-62. 2005.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine Consumption. **Fd Chem. Toxic.** 34(1). 119-129. 1996.

BATAGLION, G. A. et al. Determination of geochemically important sterols and triterpenols in sediments using UHPLC-MS/MS. **Anal. Chem.** 87. 7771-7778. 2015.

BATAGLION, G. A. et al. Quantification of Sterol and Triterpenol Biomarkers in Sediments of the Cananéia-Iguape Estuarine-Lagoonal System (Brazil) by UHPLC-MS/MS. **International Journal of Analytical Chemistry**. 2016.

BELDEAN-GALEA, M. S. et al., Occurrence and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Tisza River and its Romanian Tributaries. **Water Air Soil Pollut.** 227. 377. 2016.

BENOTTI, M. J.; BROWNAWELL, B. J. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. **Environmental Pollution**. 157.(3). 994-1002. 2009.

BICUDO. C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUENSTUHL, M. C. B. **Waters of Brazil: Strategic Analysis**: Springer International Publishing Switzerland. 2017.

BIRK, J. J. et al. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. 1242 1-10. 2012.

BITTENCOURT, et al. Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Eng Sanit Ambient**. 21(1). 43-53. 2016.

BORGES, M. G. M.; SANTOS, E. C. Gestão ambiental e preservação de nascentes: um estudo para elaboração de políticas de gestão ambiental da nascente do igarapé do Mindu, no bairro Cidade de Deus- Manaus/AM. **Revista Geográfica de América Central**. 1. 1-12. 2011.

BRASIL, Ministério das Cidades. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). Disponível em <http://www.snis.gov.br/> . Acesso em 15 de setembro de 2018.

BRASIL, Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U. 2005.

BRASIL, Resolução CONAMA nº375 de 29 de agosto de 2006 E 29 DE AGOSTO DE 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Publicado no D.O.U. 2006

BRASIL. Agência Nacional De Águas (ANA). Regiões hidrográficas brasileiras edição especial. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 162 de 11 de setembro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Uso racional de medicamentos: temas selecionados / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – Brasília: Ministério da Saúde. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio ambiente. Resolução n. 32, de 15 de outubro de 2003. Conselho nacional de Recursos Hídricos (CNRH). 2003.

BRASIL. Ministério dos Transportes. Plano Hidroviário Estratégico - PHE. Brasília. Consórcio ARCADIS logos. 2013.

BRÁZOVÁ, T.; HANZELOVÁ, V.; MIKLISOVÁ, D. Bioaccumulation of six PCB indicator congeners in a heavily polluted water reservoir in Eastern Slovakia: tissue-specific distribution in fish and their parasites. **Parasitol. Res.** 111. 779-786. 2012.

BRINGEL, S.R.B. Estudo do nível de poluição nos igarapés do Quarenta e do Parque Dez de Novembro. Relatório Técnico. **Instituto de Tecnologia da Amazônia**- UTAM. Manaus. 61. 1986.

BUJAGIC, I. M. et al. Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia, **Environmental Pollution**. 213. 76-83. 2016.

BUSTILLOS, O. V. et al. **A espectrometria de massas quadrupolar**. 1 ed. Vol. 1. Scortecci. São Paulo. 2003.

BUTH, J.M. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment aquatic photochemistry of chlorinated triclosan derivatives: potential source of polychlorodibenzo- P -DIOXINS. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 28(12). 2555-2563. 2009.

CABRAL, A. C. et al. An integrated evaluation of some faecal indicator bacteria (FIB) and chemical markers as potential tools for monitoring sewage contamination in subtropical estuaries. **Environmental Pollution**. 235. 739-749. 2018.

CAI, Y. et al., Sustainable urban water resources management considering life-cycle environmental impacts of water utilization under uncertainty. Resources. **Conservation and Recycling**. 108. 21-40. 2016.

CAMILLERI, J., VULLIET, E. Determination of steroid hormones in sediments based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (modified-QuEChERS) extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical Methods**. 7. 9577-9586. 2015.

CARACCILOLO, A. B.; TOPP, E.; GRENNI, P. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 106. 25-36. 2015.

CARREIRA, R. S. et al. Lipids in the sedimentary record as markers of the sources and deposition of organic matter in a tropical Brazilian estuarine-lagoon system et al. **Marine Chemistry**. 127. 1-11. 2011.

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**. 60 (4). 587-598. 2004.

CARVALHO, A. C. C., et al. A ocorrência de cafeína em águas superficiais para abastecimento público. **Eng Sanit Ambient.** 27(4). 845-852. 2022.

COELHO, L. H. G. et al. Estrogenic Hormones in São Paulo Waters (Brazil) and Their Relationship with Environmental Variables and *Sinapis alba* Phytotoxicity. **Water Air Soil Pollut.** 231-150. 2020.

Comparison of LCMS and other techniques. **SHIMADZU**. Adaptado de https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/comparison_of_lcms.html . Acesso em 22 de julho de 2021.

COSTA, J. S. Relatório de situação da bacia hidrográfica do Tarumã-açu: transformações e qualidade da água. Manaus-AM. 1ed. 2020.

COSTA, L. A. A.; PESSOA, D. M. M.; CARREIRA, R.S. Chemical and biological indicators of sewage river input to an urban tropical estuary (Guanabara Bay, Brazil). **Ecological Indicators.** 90. 513-518. 2018.

DA CUNHA, D. L. et al. Atividade estrogênica de desreguladores endócrinos em águas superficiais do município de Santa Maria Madalena, Sudeste do Brasil. **Eng Sanit Ambient.** 26(1). 21-28. 2021.

DANGELO, J G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica.** 2 ed. Atheneu, São Paulo. 2002.

DARBRE, P. D. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of applied toxicology.** 24(1). 5-13. 2004.

DARWANO, H.; DUYN, S. V.; SAUVE, S. A New Protocol for the Analysis of Pharmaceuticals, Pesticides, and Hormones in Sediments and Suspended Particulate Matter From Rivers and Municipal Wastewaters. **Arch Environ Contam Toxicol.** 66. 582-593. 2014.

DAVID, A.; PANCHARATNA, K. Developmental anomalies induced by a nonselective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology.* 27(3). 390-5. 2009.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Quim. Nova.**30(1). 99-105. 2007.

EL-ANEED A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**. 44. 210-230. 2009.

FAYAD, P. B. et al. Degradation of progestagens by oxidation with potassium permanganate in wastewater effluents. **Chemistry Central Journal**. 7.84. 2013.

FENT, K.; ZENKER, A.; RAPP, M. Widespread occurrence of estrogenic UVfilters in aquatic ecosystems in Switzerland. **Environmental pollution**. 158(5). 1817-1824. 2010.

FENT, K. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems Concentrations, effects and risk assesement. **Environment International**. 84. 115-130. 2015.

FERRARI, B. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and environmental safety**. 55(3). 359-70. 2003.

FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. **Caderno de Saúde Pública**. 21(6). 1889-1892. 2005.

FRENA, M. et al. Assessment of anthropogenic contamination with sterol markers in surface sediments of a tropical estuary (Itajaí-Açu, Brazil). **Science of the Total Environment**. 544. 432-438. 2016.

FRENA, M. et al. Sterol biomarkers and fecal coliforms in a tropical estuary: Seasonal distribution and sources. **Marine Pollution Bulletin**. 139. 111-116. 2019.

FROEHNER, S, et al. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**. 64. 75-9. 2012.

FURTULA, V. et al. Inorganic nitrogen , sterols and bacterial source tracking as tools to characterize water quality and possible contamination sources in surface water. **Water Res.** 46. 1079 – 1092. 2011.

GARDINALI, P. R.; ZHAO, X. Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography--atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS). **Environment international.** 28(6). 521-8. 2002.

GHISELLI, G. Tese de doutorado: Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento publico da região de Campinas: Ocorrência e determinação de interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Orientador: Wilson de Figueredo Jardim. Campinas 27b de setembro de 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim. Nova.** 30(3). 695-706. 2007.

GINEBREDA, A. et al. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). **Environment international.** 36(2). 153-62. 2010.

GLASSMEYER, S.T. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. **Environ. Sci. Technol.** 39. 5157-5169. 2005.

GONÇALVES, E. S.; RODRIGUES, S. V.; SILVA-FILHO, E.V. The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. **Rev. Ambient. Água.** 12(2). 2017.

GRIMALT, J.O. et al. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal **Waters Environ. Sci. Technol.** 24. 357-363. 1990.

GUO, Y.; KANNAN, K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. **Environmental Science & Technology.** 47. 142-149. 2013.

HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. **Environmental Science & Technology.** 39(6). 1420-1426. 2005.

HAMAN, C.; DAUCHY, X.; ROSIN, C.; MUNOZ, J. F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. **Water Research.** 68. 1-11. 2015.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research.** 46. 5813-5833. 2012.

HANSEN, M. C., et al. High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. **Science.** 342(6160). 850-853. 2013.

HERNANDO, M. D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta.** 69(2). 334-42. 2006.

HOFFMANN & STROOBANT. **Mass Spectrometry - Principles and Applications.** 3 ed. Wiley. Englad. 2007.

HUSSAIN, M. A.; FORD R. HILL J. Determination of fecal contamination indicator sterols in an Australian water supply system. **Environ Monit Assess.** 165. 147-157. 2010.

JAUKOVIĆ, Z. D. et al. Determination of sterols and steroid hormones in surface water and wastewater using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Microchemical Journal.** 135. 39-47. 2017.

IDE, A. H. et al. Occurrence of Pharmaceutical Products, Female Sex Hormones and Caffeine in a Subtropical Region in Brazil. **Clean -Soil, Air, Water**. 45(9). 2017.

IDE, A. H. et al. Utilização da Cafeína como Indicador de Contaminação por Esgotos Domésticos na Bacia do Alto Iguaçu. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**. 18(2). 201-211. 2013.

INDELICATO, S. et al. Multivariate analysis of historical data (2004 - 2013) in assessing the possible environmental impact of the Bellolampo landfill (Palermo). **Environ Monit Assess** . 190. 216. 2018.

IMEH-NATHANIEL, A.; et al. Effects of chronic cocaine, morphine and methamphetamine on the mobility, immobility and stereotyped behaviors in crayfish, Behav. **Brain Res**. 332. 120-125. 2017.

ISOBE, T et al. Horizontal distribution of steroids in surface sediments in Tokio Bay. **Environmental Pollution**. 144. 632-638. 2006.

KAWAKAMI, S. K. & MONTONE, R. C. An efficient ethanol-based analytical protocol to quantify faecal steroids in marine sediments. **Chem. Soc.**13(2). 226-232. 2002.

KHALIK, W. M. A. W. M. et al. Caffeine Residue in Terengganu River Basins in Malaysia: Distribution and Risk Assessment. **Nature Environment and Pollution Technology**. 19(2). 2020.

KNEE, K. L. et al. Caffeine and agricultural pesticide concentrations in surface water and groundwater on the north shore of Kauai (Hawaii, USA). **Marine Pollution Bulletin**. 60(8). 1376–1382. 2010.

KILLOPS, S.D; KILLOPS, V. J. **Introduction to organic geochemistry**. 2 ed. USA. Blackwell Publishing. 2005.

KOZLOWSKA-TYLINGO, K. et al Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples-A Review of Chromatographic Methods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 40. (3). 194-201. 2010.

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**. 35. 997-1003. 2009.

LA ROVERE, A.L.N. Crespo, S. **Projeto geo cidades: relatório ambiental urbano integrado: GEO MANAUS**. Rio de Janeiro, Consórcio Parceria 21. 2002.

LAHTI, M.; OIKARI, A. Microbial transformation of pharmaceuticals naproxen, bisoprolol, and diclofenac in aerobic and anaerobic environments. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 61(2). 202-210. 2011.

LE, T. M. K., et al. A multivariate approach for evaluation and monitoring of water quality in mining and minerals processing industry. *Miner. Eng.* 157. 106582. 2020.

LEEMING, R. et al. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. **Wat. Res.** 30(12). 2893-2900. 1996.

LELO, A. Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. **Br. J. Clin. Pharmac.** 22. 183-186. 1986.

LEMBCKE, J., et al. Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**. 46. 21-26. 2004.

LI, W. et al. Spatial distribution, temporal variation and risks of parabens and their chlorinated derivatives in urban surface water in Beijing, China. **Science of the Total Environment**. 539. 262-270. 2016.

LIN, Y. et al. Occurrence of pharmaceuticals, hormones, and perfluorinated compounds in groundwater in Taiwan. **Environ Monit Assess**. 187-256. 2015.

LIU, J.-L., WONG, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. **Environment International**. 59. 208-224. 2013.

LUIGI, V., GIUSEPPE, M., CLAUDIO, R. Emerging and priority contaminants with endocrine active potentials in sediments and fish from the River Po (Italy). **Environmental Science Pollution Research**. 22.1050-1066. 2015.

MACHADO, ZANETI E HIGUCHI, A degradação dos cursos hídricos urbanos, uma abordagem sobre gestão e educação ambiental. **Revista Ibero-Americana de Estudos em Educação**. 14(3). 1124-1138. 2019.

MANIRAKIZA, P., et al. Automated soxhlet extraction and single step clean-up for the determination of organochlorine pesticides in soil by GC-MS or GC-ECD. **Int. J. Environ. Anal. Chem.** 81. 25-39. 2001.

MARASCO C. A. JR; LUCHIARI N. C.; GOMES P. C. F. L. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. **Eclética Química Journal**. 44(4). 11-26. 2019.

MARQUES, J. P. C.; PINHEIRO E. DA S. O desflorestamento na metrópole da Amazônia Central: Manaus/AM. In: Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Curitiba, PR, Brasil, **INPE**. p.2882. 30 de abril a 05 de maio de 2011.

MARTINS, C. C. et al. Baseline concentrations of faecal sterols and assessment of sewage input into different inlets of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**. 78. 218-223. 2014.

MARTINS, C. C. et al. Sewage organic markers in surface sediments around the Brazilian Antarctic station: Results from the 2009/10 austral summer and historical tendencies. **Marine Pollution Bulletin**. 64. 2867-2870. 2012.

MARTINS, C. C.; FILLMANN, G.; MONTONE, R. C. Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos Lagoon, Brazil. **Chem. Soc.** 18. 106-115. 2007.

MATIC' BUJAGIC', I et al. Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia. **Environ. Pollut.** 213. 76-83. 2016.

MATIĆ BUJAGIĆ, I.; GRUJIĆ, S.; JAUKOVIĆ, Z.; LAUŠEVIĆ, M. Trace analysis of selected hormones and sterols in river sediments by liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization- tandem mass spectrometry. **Jornal of Chromatography A**. 1364, 177-127. 2014.

MCAVOY, D. C. et al. Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. **Environmental Toxicology and Chemistry**.21(7). 1323- 1329. 2002.

MELO et al. Sewage contamination of Amazon streams crossing Manaus (Brazil) by sterol biomarkers. **Environmental Pollution**. 244. 818-826. 2019.

MELO et al., Metals, n-Alkanes, Hopanes, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in Sediments from Three Amazonian Streams Crossing Manaus (Brazil). **Chemistry**. 2. 274–292. 2020.

MELO et al. Correlation between caffeine and coprostanol in contrasting Amazonian water bodies. **Chemosphere**. 326. 138365. 2023.

MIZUKAWA, A. et al. Caffeine as a chemical tracer for contamination of urban rivers. **RBRH**. 24(29). 2019.

MO. S., et al. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Lipids**. 48. 949-956. 2013.

MOLINS-DELGADO, D.; SILVIA DÍAZ-CRUZ, M.; BARCELÓ, D. Removal of polar UV stabilizers in biological wastewater treatments and ecotoxicological implications. **Chemosphere**. 119. 51-57. 2014.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**.22(8). 1452-1462. 2011.

MORAES, D. S. L; JORDÃO B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev Saúde Pública**. 36(3). 370-4. 2002

MOREIRA, M. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**. 32(12). 1409-1417. 2011.

MUANGTHONG, S. & SHRESTHA, S. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: case study of the Nampong River and Songkhram River, Thailand. **Environ. Monit. Assess.** 187. 2015.

MUDGE, S.M.; BEBIANNO, M.J. Sewage contamination following an accidental spillage in the Ria Formosa, Portugal. **Mar. Pollut. Bull.** 34. 163-170. 1997.

NAKAGAWA, K. et al. Use of sterols to monitor surface water quality change and nitrate pollution source. **Ecological Indicators**. 107. 10553. 2019

NATHANSON, J. A. Caffeine and Related Methylxanthines: Possible Naturally Occurring Pesticides. **SCIENCE**. 226. 1984

NOGUEIRA, A. C. F.; SANSON, F.; PESSOA K. A expansão urbana e demográfica da cidade de Manaus e seus impactos ambientais. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, **INPE**, 5427-5434, Florianópolis. Brasil, 21-26 abril 2007.

OJOGHORO et al. Progesterone potentially degrades to potent androgens in surface Waters. **Science of the Total Environment**. 579. 1876-1884. 2017.

OLIVEIRA, M. L. et al. **Reserva Ducke: A biodiversidade Amazônica através de uma grade**. Manaus. INPA. 166 p. 2011.

OLSEN, R. L.; CHAPPELL, R. W.; LOFTIS, J. C. Water quality sample collection, data treatment and results presentation for principal components analysis - literature review and Illinois River watershed case study. **Water Res.** 46. 3110 - 3122. 2012.

OMS. Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS. Promoción del uso racional de medicamentos: componentes centrales. Organización Mundial de la Salud. Geneva. 2002.

OTOMO, J. I. et al. Avaliação de estrógenos nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP. Evento: 2º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente Bento Gonçalves-RS, Brasil, 28 a 30 de abril de 2010.

PAGÁN, O. R .et al. Planarians require an intact brain to behaviorally react to cocaine, but not to react to nicotine. **Neuroscience**. 246. 265-270. 2013.

PARRISH, C. C.; HORACIO, P.; CARRE, L. Urban sewage lipids in the suspended particulate matter of a coral reef under river in fluence in the South West Gulf of Mexico. **Water Research**. 123. 2017.

PAROLINI, M.; BINELLI, A. Oxidative and genetic responses induced by Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) to dreissena polymorpha. **Science of the Total Environment**. 68(76). 468-469. 2014.

PEELER, J. A; OPSAHL, S.P; CHATON, J. P. Tracking Anthropogenic Inputs Using Caffeine, Indicator Bacteria, and Nutrients in Rural Freshwater and Urban Marine Systems. **Environ. Sci. Technol**. 40, 7616-7622. 2006.

PETEFFI, G. P. et al. Caffeine levels as a predictor of Human mastadenovirus presence in surface Waters-a case study in the Sinos River basin-Brazil. **Environ Sci Pollut Res**. 25. 15774-15784. 2018.

PINTO. A. G. N. et al. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. **Acta Amazônica**. 39(3). 627- 638. 2009.

PIO, M.C.S., ANTONY, L.P., SANTANA, G.P. Wetlands Construídas (Terras Alagadas): Conceitos, Tipos e perspectivas para remoção de metais potencialmente tóxicos de água contaminada: uma revisão. **Scientia Amazonia**. 2. 28-48. 2013.

PLATIKANOV, S., et al. Multivariate analysis of the operational parameters and environmental factors of an industrial solar pond. **Sol. Energy**. 223. 113 – 124. 2021.

POIGER, T. et al. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. **Chemosphere**. 55 (7). 951-63. 2004.

POIRIER-LARABIE, S.; SEGURA, P. A.; GAGNON, C. Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. **Sci. Total Environ**. 557(58). 257-267. 2016.

PORTO, M. F; PORTO, R. L. L. Gestão de bacias hidrográficas. **Estudos Avançados**. 22. (63). 2008.

PORWIK, P.; DOROZ, R.; ORCZYK, T. The k-NN classifier and self-adaptive Hotelling data reduction technique in handwritten signatures recognition. **Pattern Anal. Appl**. 18. 983 - 1001. 2015.

PUSCEDDUA, F. H. et al. Estrogen levels in surface sediments from a multi-impacted Brazilian estuarine system. **Marine Pollution Bulletin**. 142. 576-580. 2019.

QIN, S. J. Statistical process monitoring: Basics and beyond. **J. Chemom**. 17. 480 - 502. 2003.

REIS SOUZA, M. R. et al. The impact of anthropogenic activity at the tropical Sergipe-Poxim estuarine system, Northeast Brazil: Fecal indicators. **Marine Pollution Bulletin**. 154. 2020.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**. 2(3). 283-288. 2007.

RESENDE, M. F. et al. The analysis of faecal sterols in sediment samples by HPLC-UV using ultrasound-assisted treatment. **Anal. Methods**. 6. 9581-9587. 2014.

RIBEIRO, A.R. et al. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched directive 2013/39/EU. **Environ. Int**. 75. 33-51. 2015.

RICHARDS, S. M. et al. Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. **Environmental toxicology and chemistry**. 23(4). 1035-1042. 2004.

RICO, A. et al. Pharmaceuticals and other urban contaminants threaten Amazonian freshwater ecosystems. **Environment International**. 155. 2021.

RIOS, J. L. P. Estudo de um Lançamento Subfluvial. Metodologia de Projeto e Aspectos Construtivos do Emissário de Manaus. Congresso Interamericano de AIDIS. Panamá. 1982.

RISSATO, R. S. et al. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soil and water samples in the Northeastern part of São Paulo State, Brazil. **Chemosphere**. 65. 1949-1958. 2006.

ROBERTS, J., et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow. **Sci. Total Environ**. 541. 1625-1637. 2016.

RODRIGUES, D. O.; SILVA, S. L. R.; SILVA, M. S. R. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar das Águas das Bacias Hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. **Acta Amazônia**. 39(4). 935-942. 2009.

SALDANHA, G.C. et al. DDT in fishes and soils of fakes from Brazilian Amazon: case study of Puruzinho Lake (Amazon, Brasil). **Braz. Chem. Soc**. 21. 306. 2010.

SANGSTER, J. L., et al. The effect of particle size on sorption of estrogens, androgens and progestagens in aquatic sediment. **Journal of Hazardous Materials**. 299. 112-121. 2015.

SANGSTER, J.L et al. Bioavailability and Fate of Sediment-Associated Progesterone in Aquatic Systems. **Environ. Sci. Technol**. 50. 4027-4036. 2016.

SANTANA, G. P. Heavy metal distribution in the sediment and hoplosternum littorale from manaus industrial. **Journal of Engineering and Chemistry**. v. 2.2.070-081. 2016.

SANTANA, G. P. Sediment-distributed metal from the Manaus Industrial District (MID) Region (AM - Brazil). **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**.1. 55-64. 2015.

SANTOS, F. M. M. S.; ALVES. N, S. A análise das ações antropogênicas nas bacias hidrográficas urbanas no município de Manaus-AM, um estudo de caso na microbacia hidrográfica do Bindá. In: Encontro de Geógrafos da América Latina- EGAL 2013, 2013, Lima-Peru. Reencontro de Saberes territoriales Latino Americanos. 2013.

SANTOS, F. R. et al. Influence of anthropogenic activities and risk assessment on protected mangrove forest using traditional and emerging molecular markers (Ceará coast, northeastern Brazil). **Science of the Total Environment**. 656. 877-888. 2019.

SANTOS, I.N.; HORBE, A.M.C.; Silva, M.S.R.; Miranda, S.A. F. Influência de um aterro sanitário e de efluentes domésticos nas águas superficiais do rio Tarumã e afluentes-AM. **Acta Amazônica**. 36(2). 229-236. 2006.

SCHLUMPF, M. et al. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. **Toxicology**. 205. (1). 113-22. 2004.

SILVA, A. R. M.; NOGUEIRA, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. **Talanta**. 74(5). 1498-1504. 2008.

SILVA, C. G. A; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quim. Nova**. 34(4). 665-676. 2011.

SIMCIK, M. F. & OFFENBERG J. H. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Great Lakes. **Hdb Env Chem**. 5. 307-353. 2006.

SIMONEIT, B. R. T. A review of current applications of mass spectrometry for biomarker/molecular tracer elucidations. **Mass Spectrom. Rev**. 24. 719-765. 2005.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**. 96. 92-98. 2010.

SODRÉ, F. F. et al. Seasonal and Spatial Distribution of Caffeine, Atrazine, Atenolol and DEET in Surface and Drinking Waters from the Brazilian Federal District. **J. Braz. Chem. Soc.** 29(9). 1854-1865. 2018.

SOJINU, S. O. et al. Assessing anthropogenic contamination in surface sediments of Niger Delta, Nigeria with fecal sterols and n-alkanes as indicators. **Science of the Total Environment**. 441. 89-96. 2012.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. a. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial. **Biological Research Association**. 43(7). 985-1015. 2005.

SOUSA, E. M. L. et al. Determination of Three Estrogens in Environmental Water Samples Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detector. **Water Air Soil Pollut.** 231-172. 2020.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**. 2019.

STOGIANNIDIS, E. & LAANE, R. Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. 234.50-121. 2015.

SULLIVAN, D. et al. Faecal sterols analysis for the identification of human faecal pollution in a non-sewered catchment. **Water Sci. Technol.** 61. 1355-1361. 2010.

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**. 225. 81-90. 1999.

THOMAS, K.V. et al. Waichman, Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil. **Water Resour.** 50. 302-308. 2014.

THOMAS, P. M.; FOSTER, G. D. Determination of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Caffeine, and Triclosan in Wastewater by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health.** 39(8). 1969-1978. 2004.

TOLOSA I.; MESA M.; ALONSO-HERNANDEZ C.M. Steroid markers to assess sewage and other sources of organic contaminants in surface sediments of Cienfuegos Bay, Cuba. **Mar. Pollut. Bull.** 86. 84-90. 2014.

TORRES, N.H. et al. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. **Environ. Monit. Assess.** 187. p. 379. 2015.

TORREZANI, L. Avaliação da contaminação antrópica por metais no sedimento de fundo na bacia do igarapé do Educandos - Manaus/Amazonas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas- UFAM. Orientador: Dr. Ézio Sargentini Júnior. 2016.

TRATA BRASIL. Instituto Trata Brasil Saneamento e Saúde. Disponível em <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-rasil/esgoto>. Acesso em 15 de junho de 2021.

TRINH, T. et al. Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** 1218. 1668-1676. 2011.

TUCCI, C. E. M. Plano diretor de drenagem: princípios e concepções. **Revista brasileira de recursos hídricos.** 2(2). 5-12. 1997.

VENKATESAN, M.I. & SANTIAGO, C.A. Sterols in oceans sediments: novel tracers to examine habits of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. **Mar. Biol.** 102. 431-437. 1989.

VENTURI, L.A.B. Recurso Natural: a construção de um conceito. **GEOUSP-Espaço e tempo**. 20. 09-17. 2006.

VIEIRA, F. C. B; BRITO, E. B. B; TEIXAIRA, A. Z. Educação ambiental: uma análise da poluição e contaminação dos igarapés urbanos na cidade de Manaus. VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista, 8(2). 360-372. 2012.

VIKASKUMAR. G. S. et al. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. **Water Research** . 41. 3691 – 3700. 2007.

VOLKMAN, J, K. Sterols in microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**. 60:495-506. 2003.

WEE, S. Y., ARIS, A. Z. Endocrine disrupting compounds in drinking water supply system and human health risk implication. **Environment International**. 106. 207-233. 2017.

WEIGEL, S. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere**. 56(6). 583-92. 2004.

WU, J. Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization, **J. Chromatogr. A** 1216. 1053-1058. 2009.

YAMAMOTO, H.; et al. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. **Water research**. 43(2). 351-62. 2009.

YASSUDA, E. R. Gestão de recursos hídricos: fundamentos e aspectos institucionais. **Rev. Adm. púb.** 27(2). 5-18. 1993.

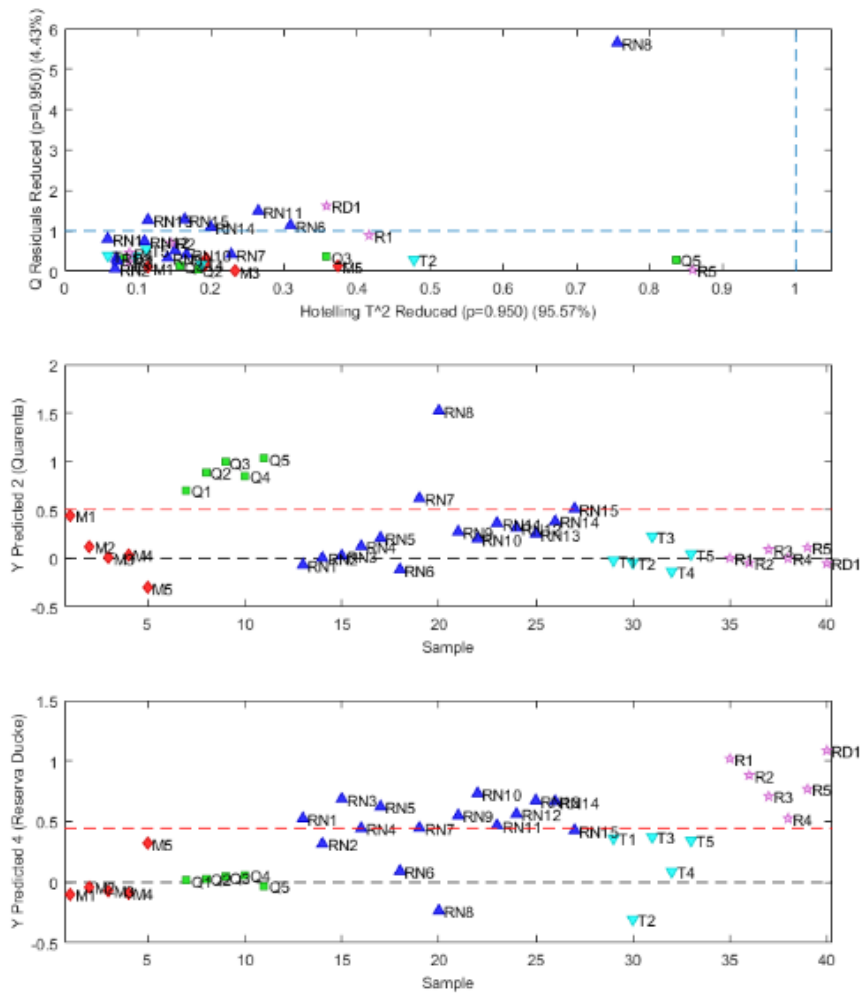
YE, X. et al. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography**. 844(1). 53-9. 2006.

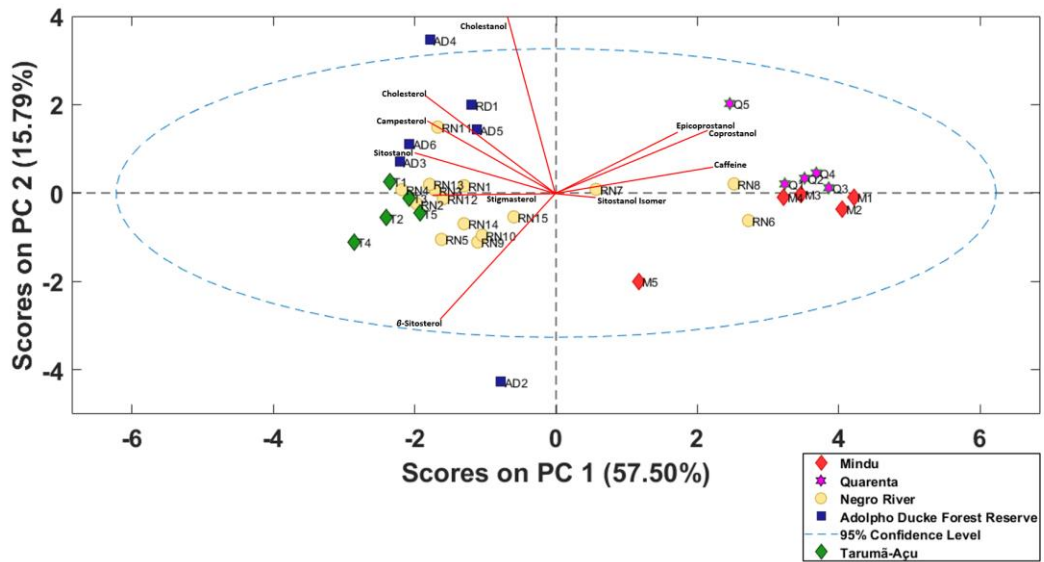
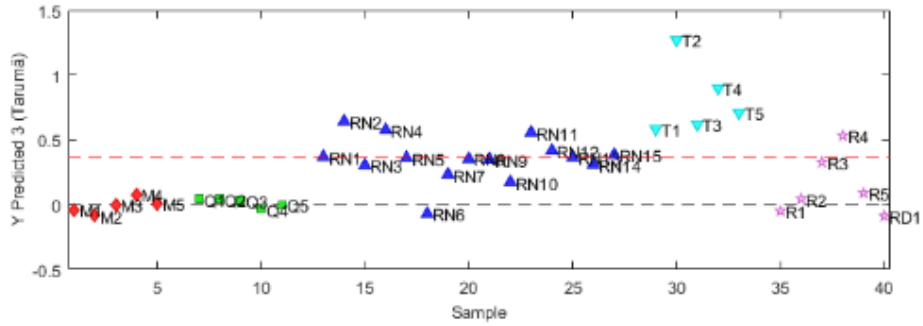
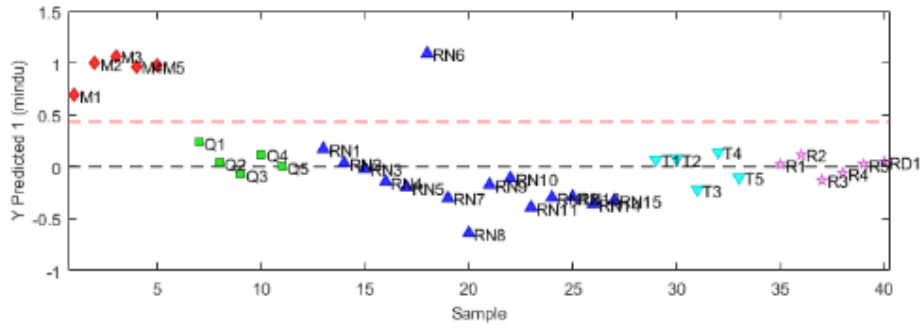
ZHANG, Q. et al. Emission Estimation and Multimedia Fate Modeling of Seven Steroids at the River Basin Scale in China. **Environ. Sci. Technol.** 48. 7982-7992. 2014.

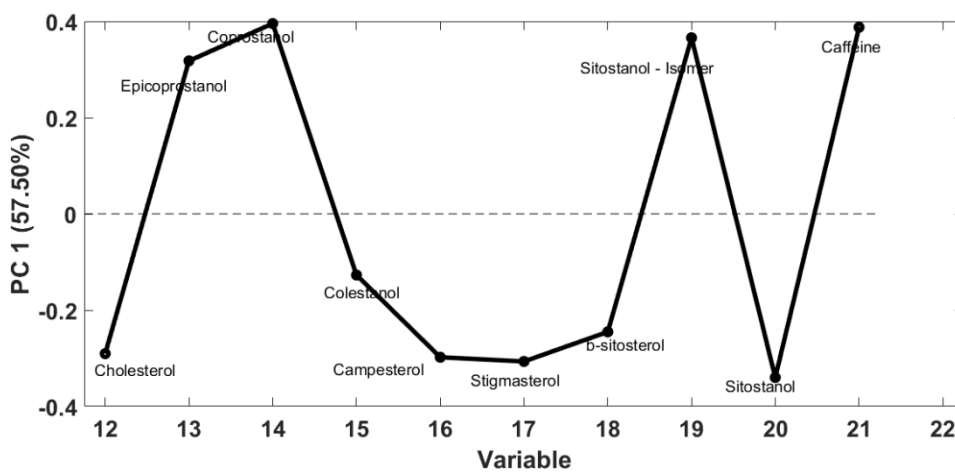
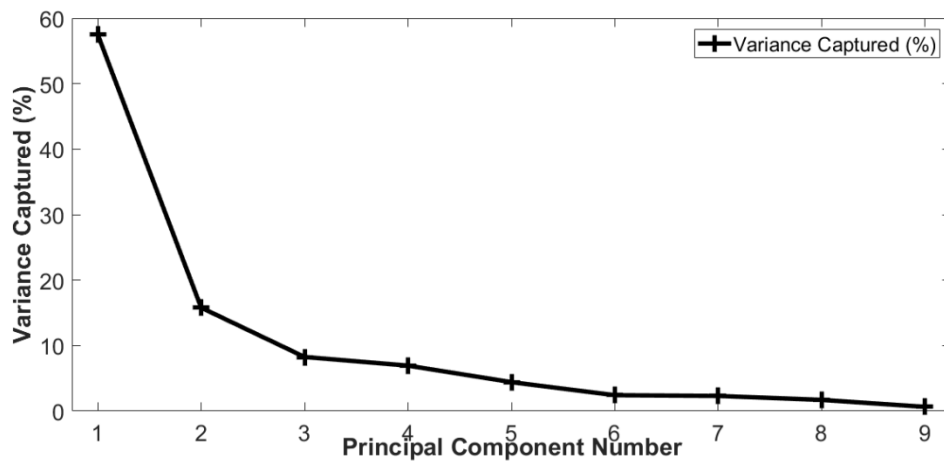
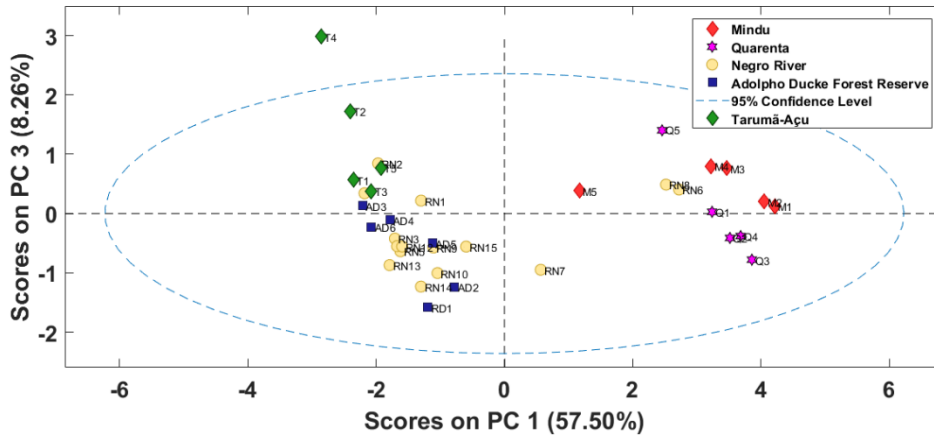
ZHAO, M. et al., Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surfasse sediments from the Bering Sea and western Arctic Ocean. **Marine Pollution Bulletin.** 104. 379-385. 2016.

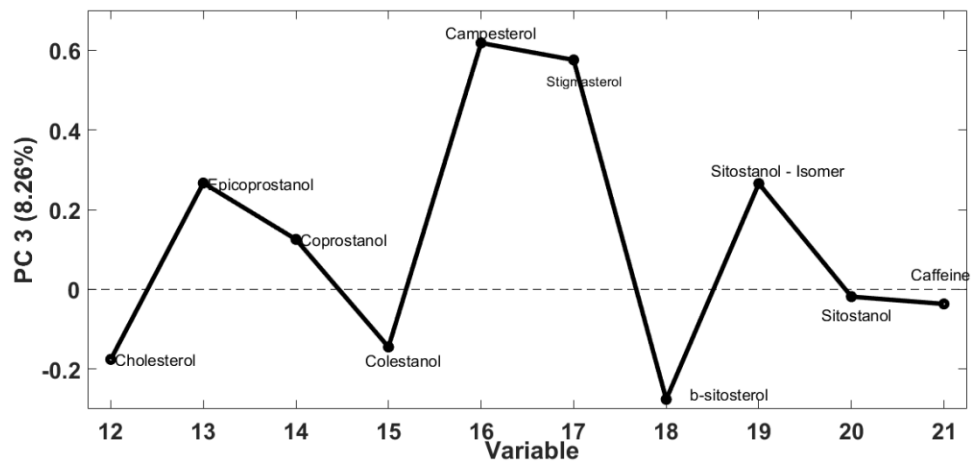
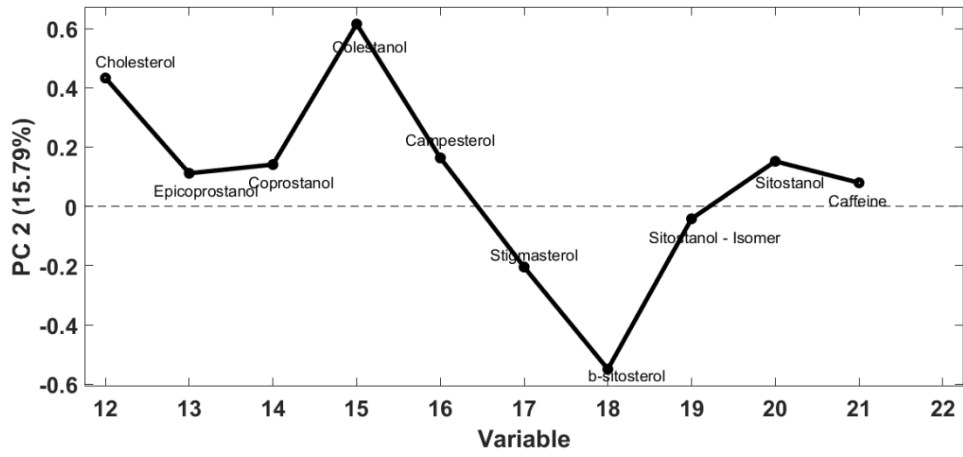
ZOCATELLI, R., et al. Fecal biomarker imprints as indicators of past human land uses: Source distinction and preservation potential in archaeological and natural archives. **Journal of Archaeo Science** .81. 79-89. 2017.

Apêndice A: gráficos estatísticos das amostras

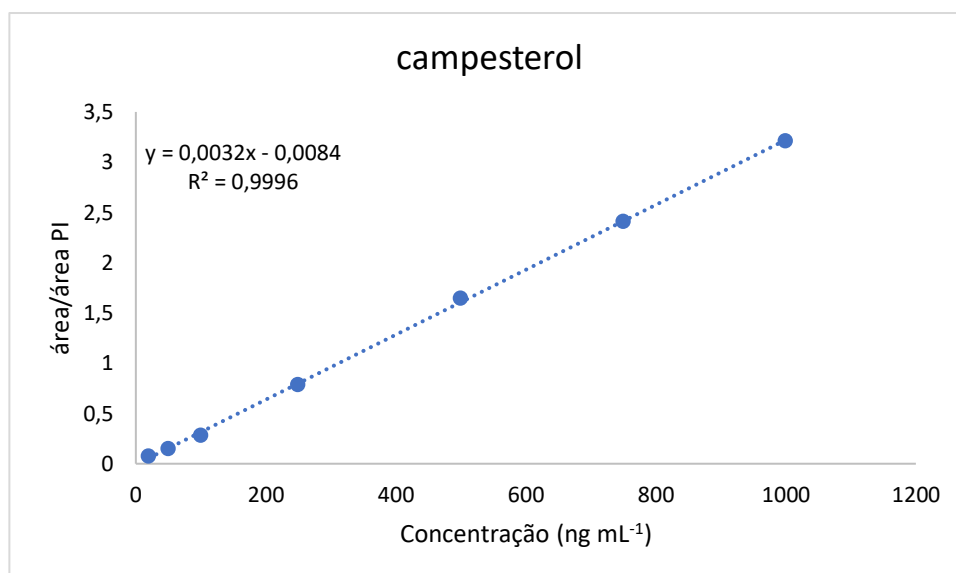
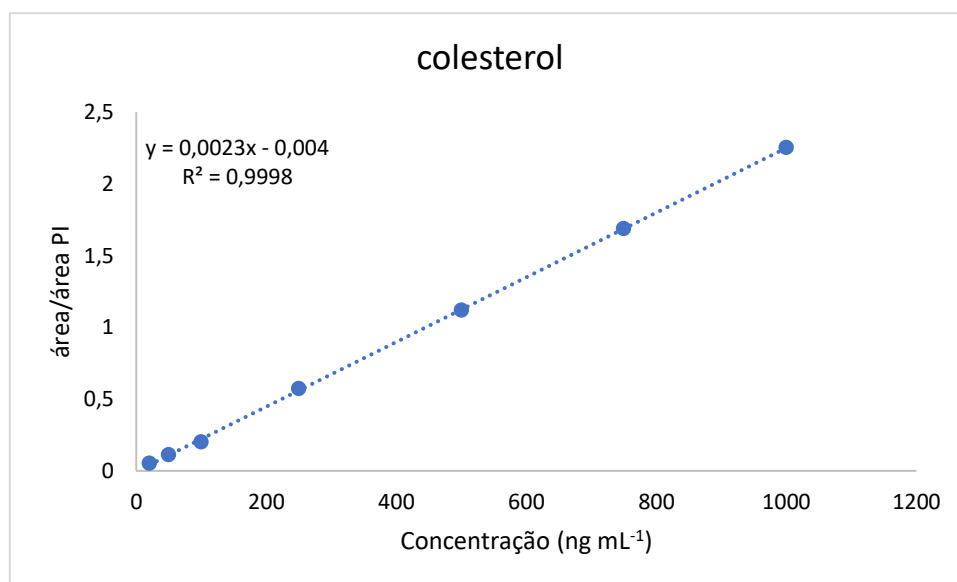


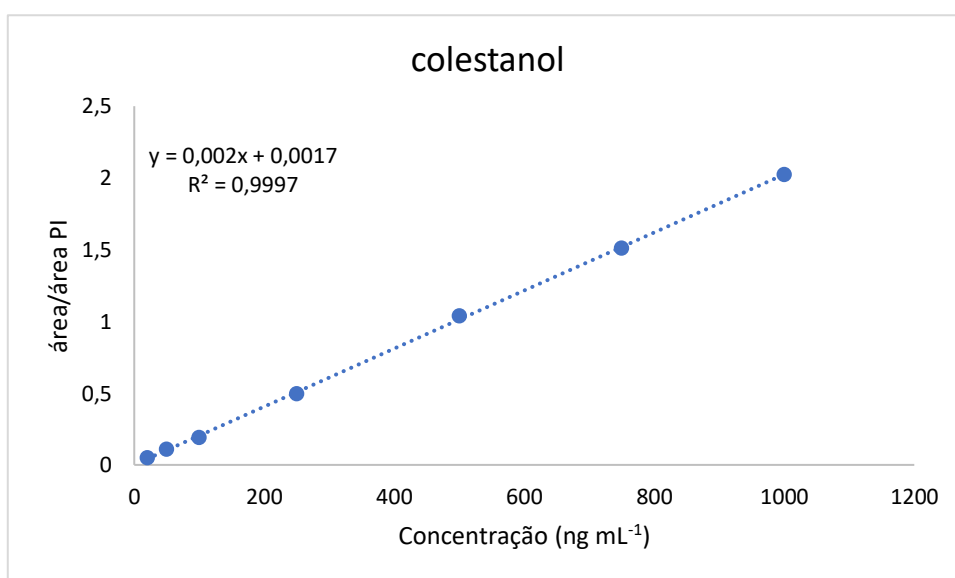
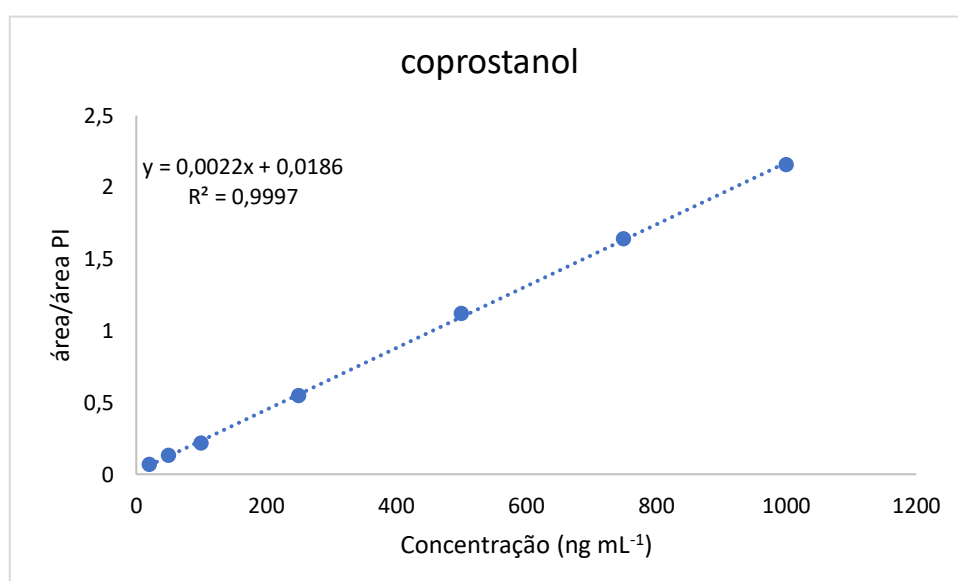
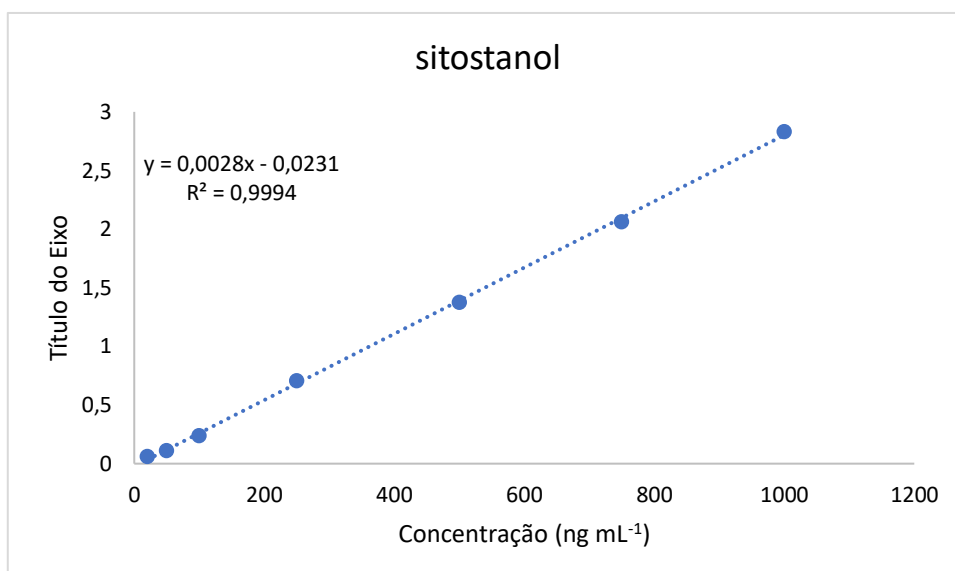


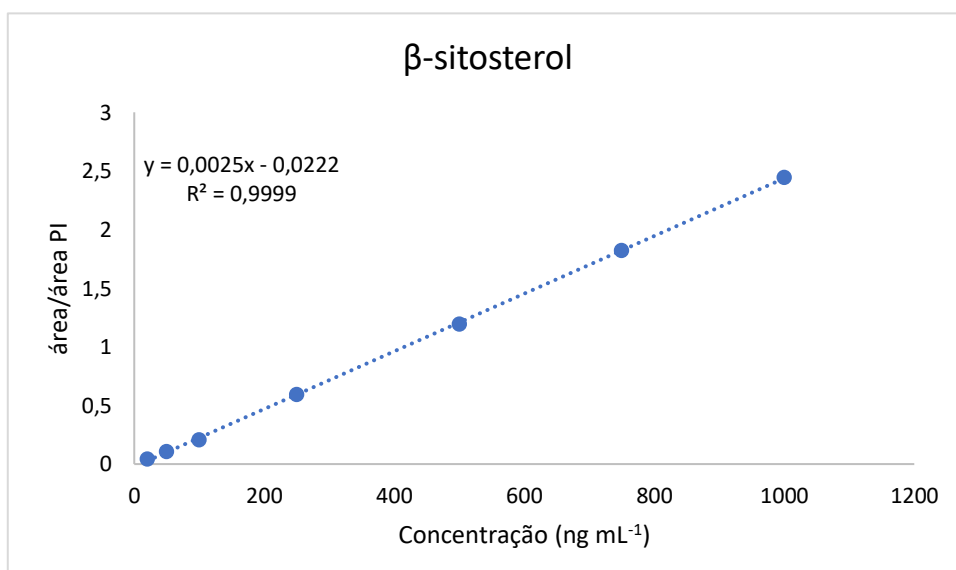
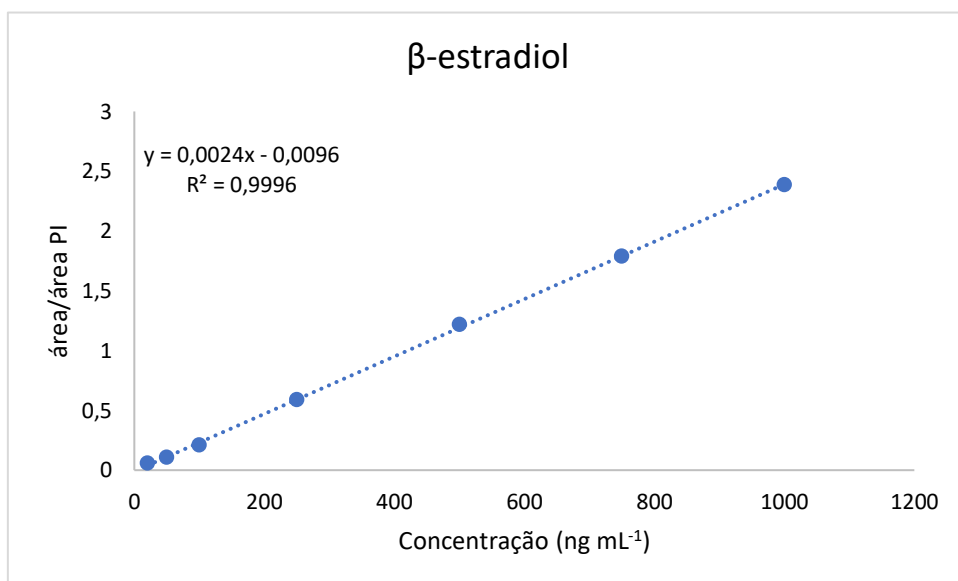
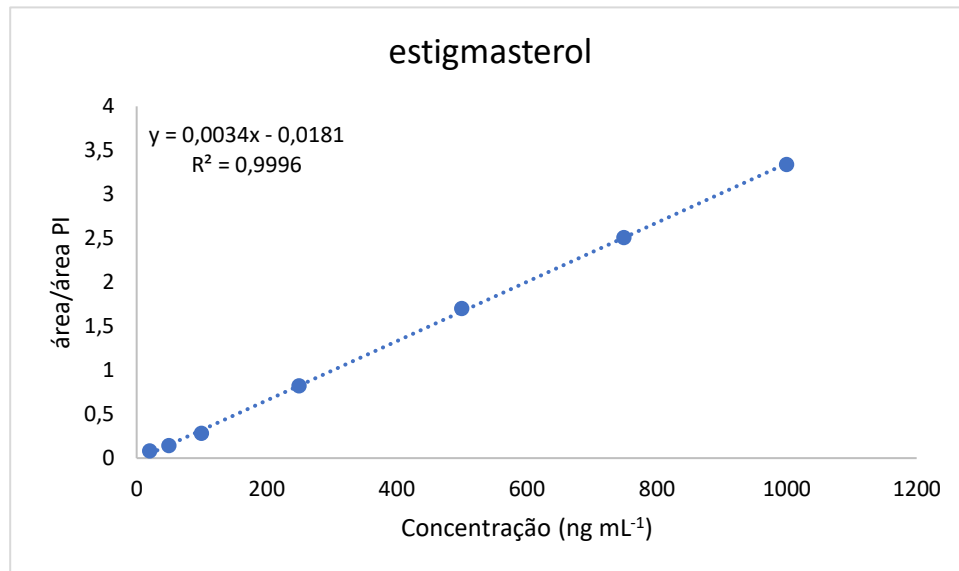


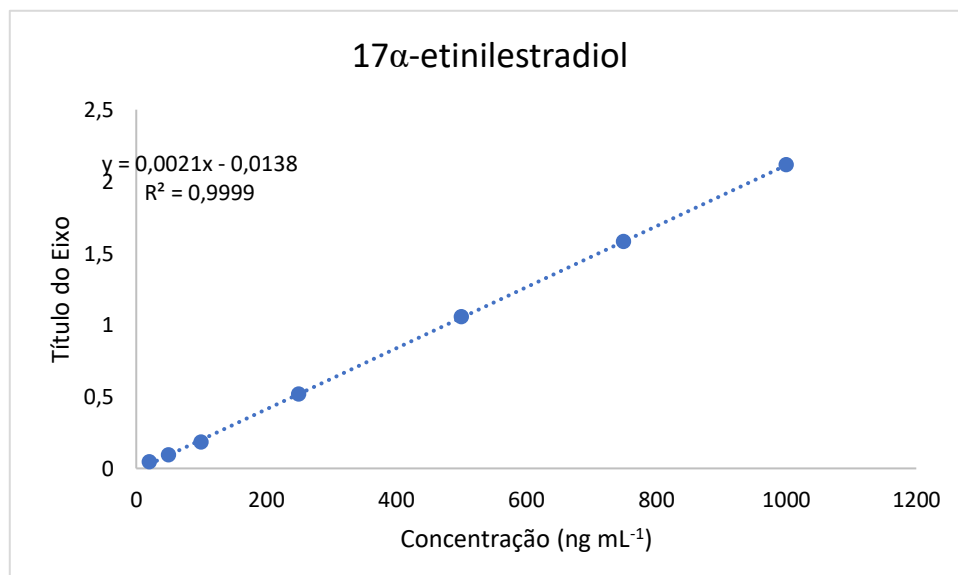
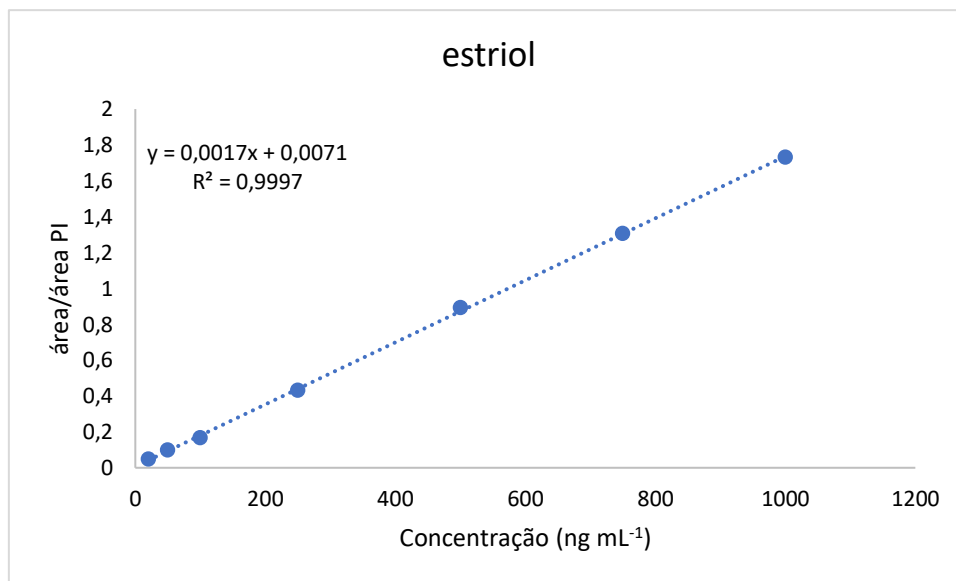
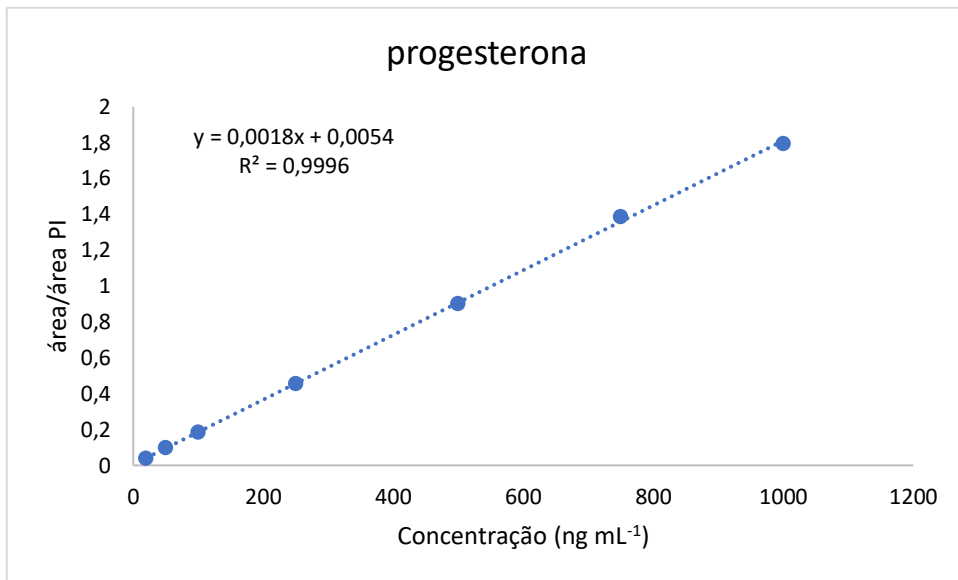


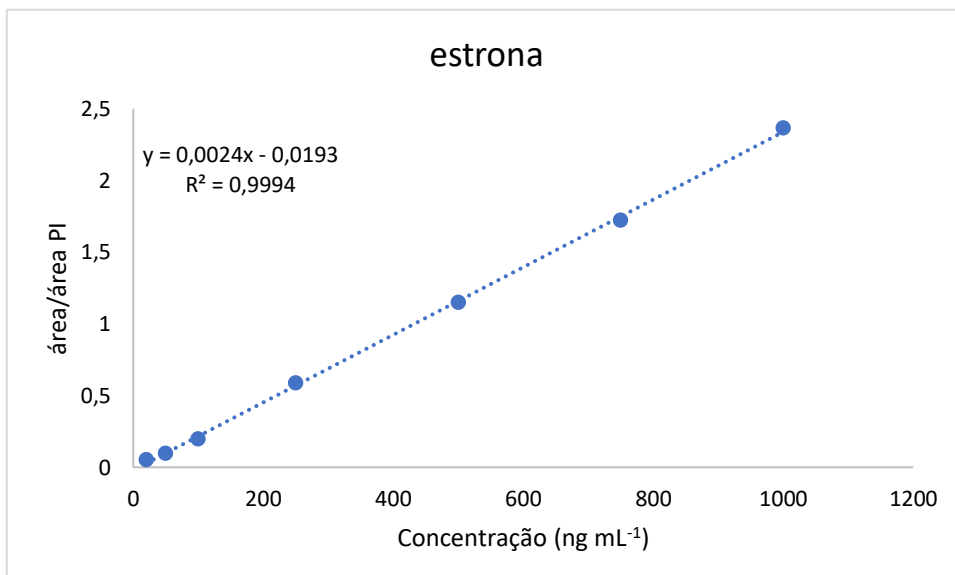
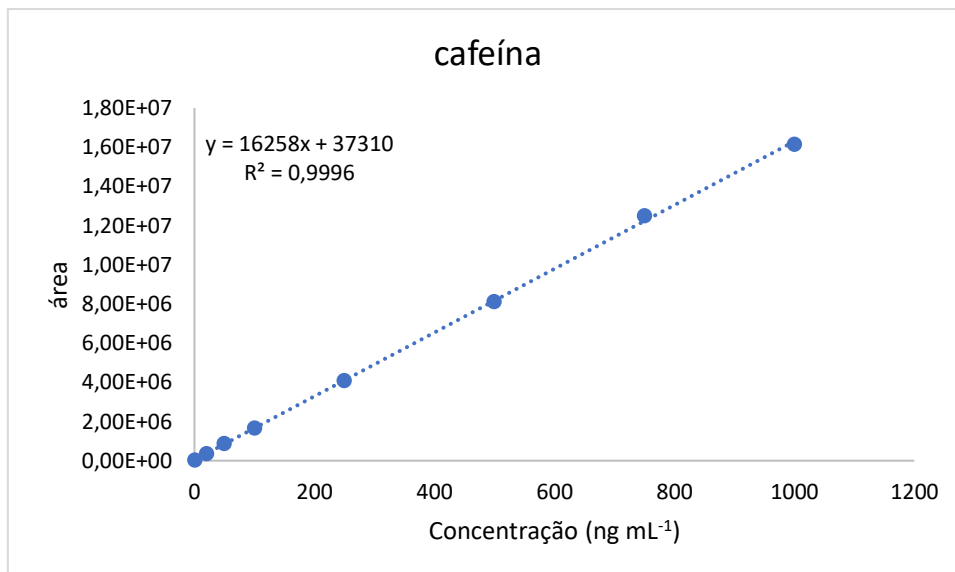
Apêndice B: curvas de calibração



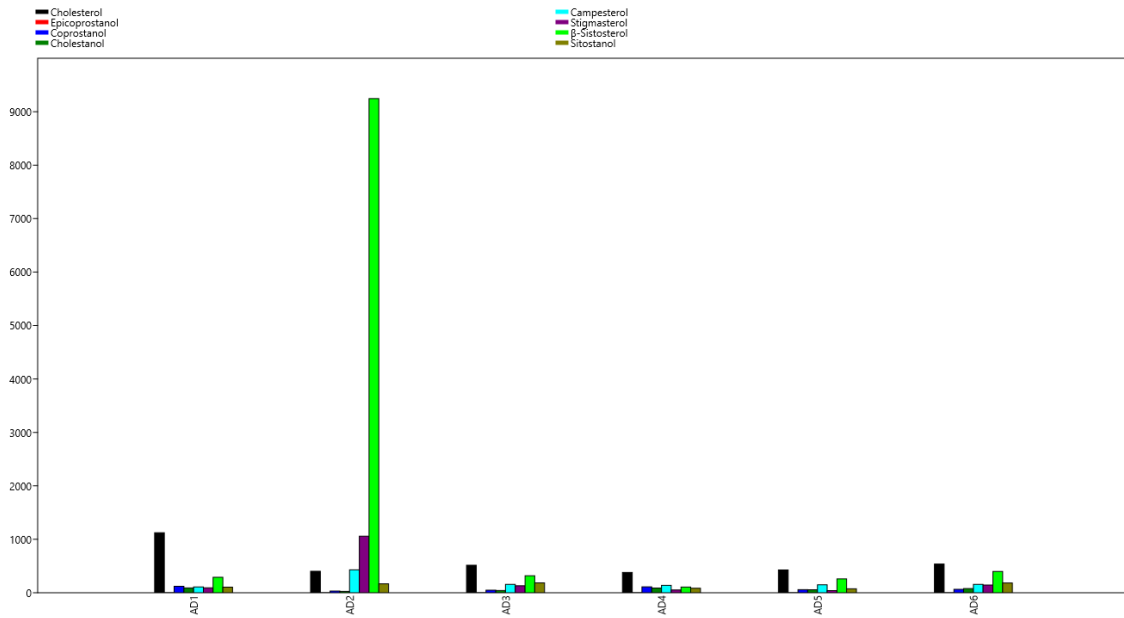




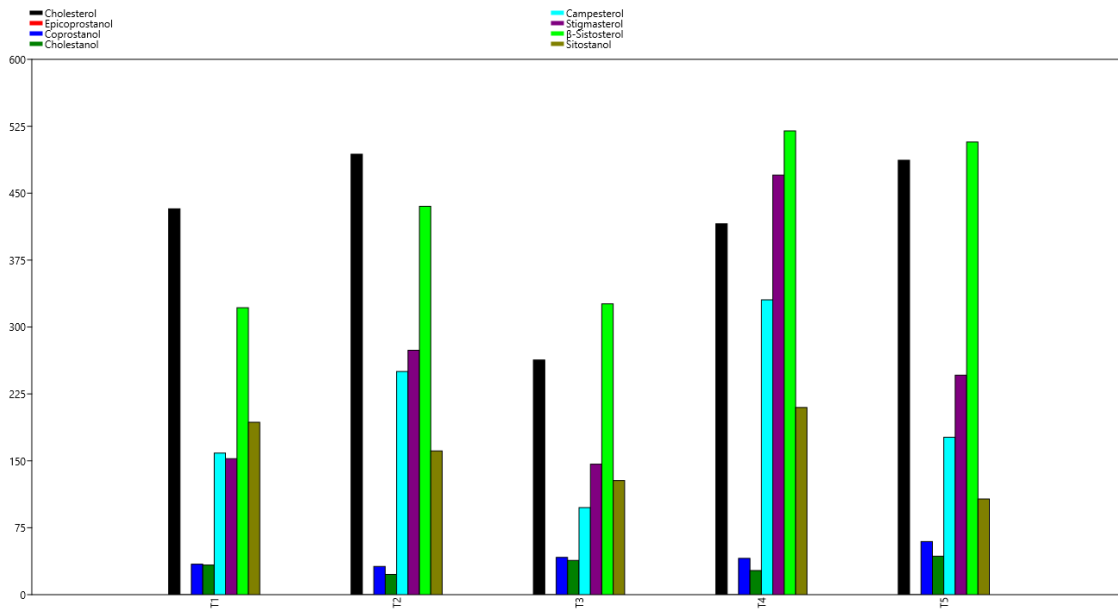




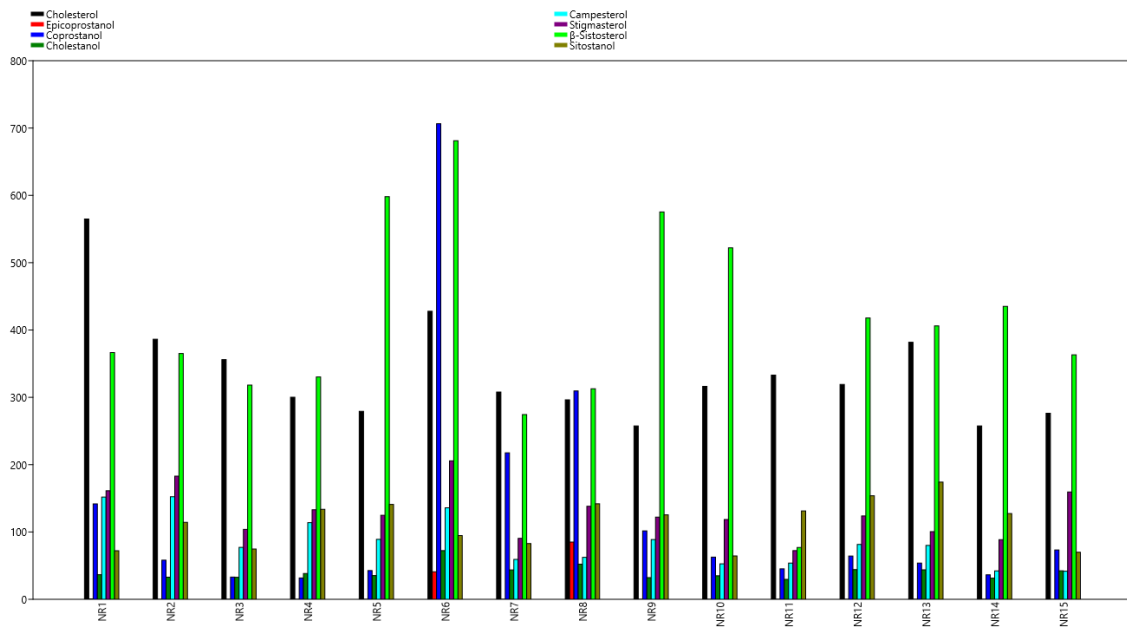
Apêndice C: gráfico comparativo das concentrações de esteróis



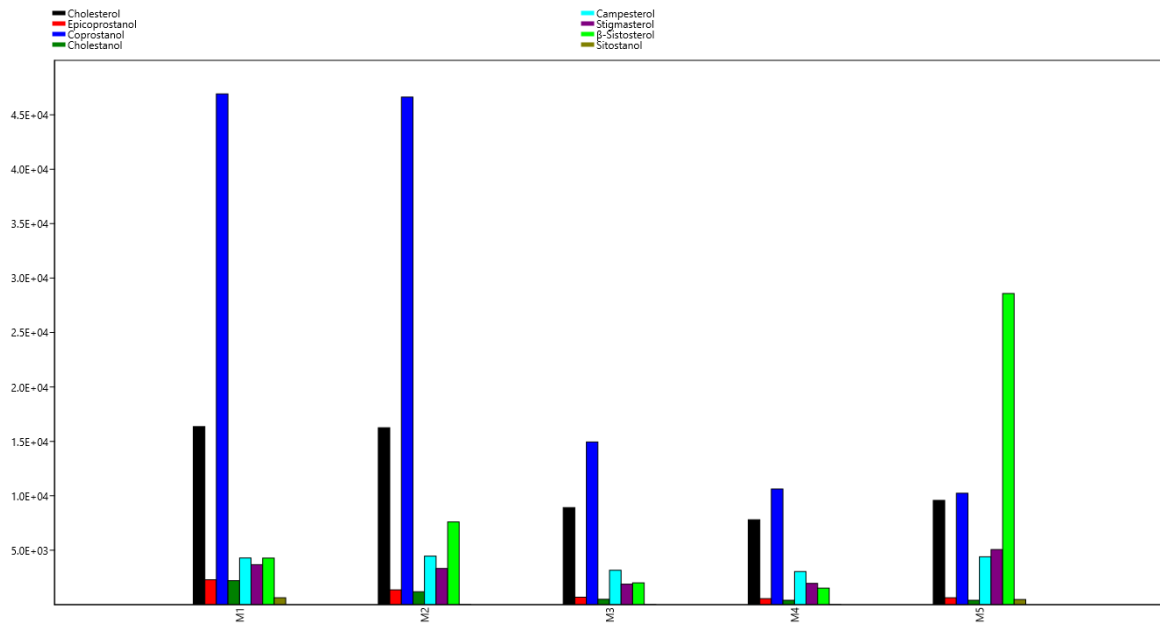
Reserva Florestal Adolpho Ducke (concentração ng L⁻¹)



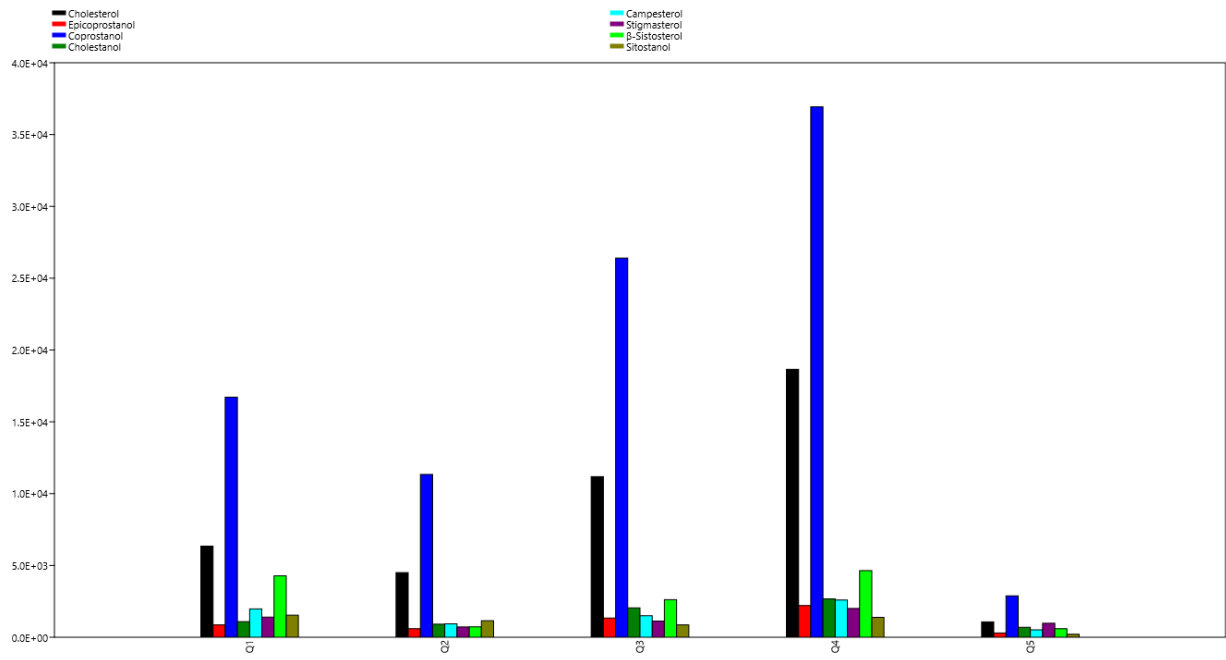
Tarumã-Açu (concentração ng L⁻¹)



Rio Negro (concentração ng L⁻¹)

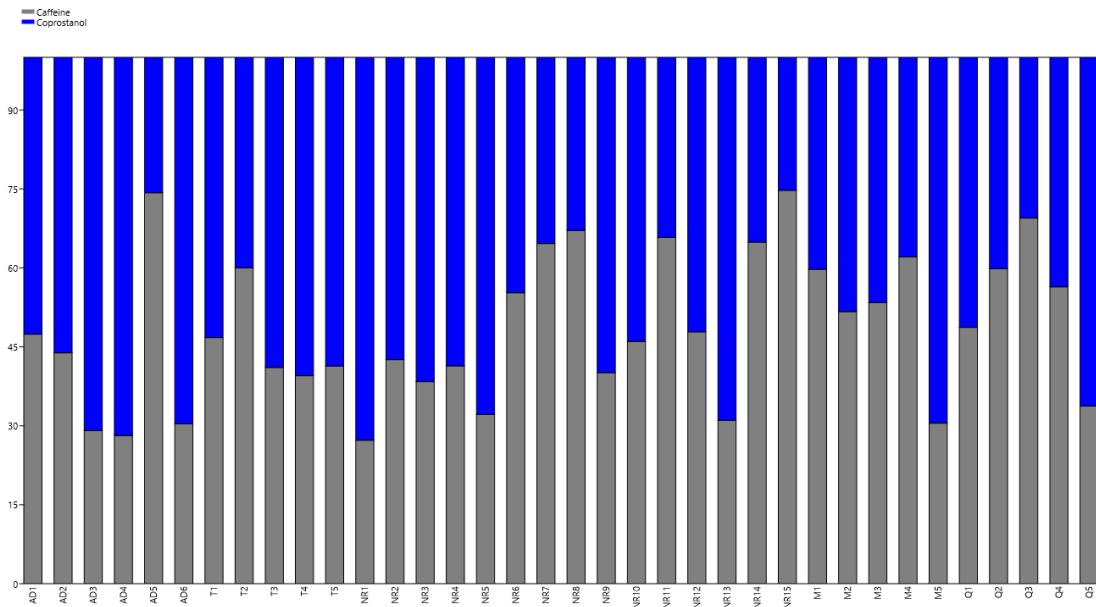


Mindu (concentração ng L⁻¹)



Quarenta (concentração ng L⁻¹)

Apêndice D: percentual de comparação entre cafeína e coprostanol



Apêndice E: área de drenagem dos igarapés da reserva Adolpho Ducke



Apêndice F: coordenadas geográficas dos pontos de coleta

| Amostras | Latitude (S) | Longitude (W) |
|------------------------------|--------------|---------------|
| <u>IGARAPÉ DO QUARENTA</u> | | |
| Q1 | 3°06'25.4" | 59°57'38.3" |
| Q2 | 3°07'00.9" | 59°58'28.3" |
| Q3 | 3°07'29.9" | 59°59'11.5" |
| Q4 | 3°07'45.0" | 59°59'39.1" |
| Q5 | 3°08'10.50" | 60°0'33.18" |
| <u>IGARAPÉ DO MINDÚ</u> | | |
| M1 | 3°02'57.7" | 59°56'51.1" |
| M2 | 3°03'43.0" | 59°57'39.8" |
| M3 | 3°04'40.0" | 59°59'29.8" |
| M4 | 3°05'13.4" | 60°00'32.0" |
| M5 | 3°06'52.0" | 60°01'58.5" |
| <u>IGARAPÉ DO TARUMÃ-AÇU</u> | | |
| T1 | 3°02'22.4" | 60°06'40.2" |
| T2 | 3°00'55.9" | 60°05'44.5" |
| T3 | 3°00'15.8" | 60°05'06.7" |
| T4 | 2°58'40.4" | 60°06'12.5" |
| T5 | 2°57'53.6" | 60°06'22.5" |
| <u>RESERVA ADOPLHO DUCKE</u> | | |
| AD1 | 2°55'07.4" | 59°54'46.4" |
| AD2 | 2°55'36.3" | 59°55'02.3" |
| AD3 | 2°56'01.9" | 59°55'13.4" |
| AD4 | 2°56'38.1" | 59°56'48.3" |
| AD5 | 2°57'04.1" | 59°57'29.1" |
| AD6 | 2°55'47.7" | 59°58'17.2" |
| <u>RIO NEGRO</u> | | |
| RN1 | 3°04'00.7" | 60°06'02.7" |
| RN2 | 3°05'43.7" | 60°04'41.1" |
| RN3 | 3°06'32.9" | 60°04'14.7" |
| RN4 | 3°06'56.5" | 60°03'38.0" |
| RN5 | 3°07'32.1" | 60°02'41.5" |
| RN6 | 3°07'44.9" | 60°02'04.1" |
| RN7 | 3°08'18.6" | 60°01'35.4" |
| RN8 | 3°08'27.3" | 60°01'02.1" |
| RN9 | 3°09'28.7" | 59°59'43.2" |
| RN10 | 3°09'10.6" | 59°58'07.3" |
| RN11 | 3°09'00.3" | 59°57'23.3" |
| RN12 | 3°08'09.5" | 59°56'17.6" |
| RN13 | 3°06'54.4" | 59°54'00.3" |
| RN14 | 3°05'35.0" | 59°53'13.5" |
| RN15 | 3°05'11.6" | 59°52'43.7" |