

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós Graduação em Química
Mestrado em Química

Michele Fabri de Resende

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS FECALIS EM
SEDIMENTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Juiz de Fora

2011

Michele Fabri de Resende

**Metodologia analítica para determinação de esteróis
fecais em sedimentos por Cromatografia Líquida de
Alta Eficiência**

Dissertação apresentada ao departamento de
Química da Universidade Federal de Juiz de
Fora, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Química

Orientadora: Professora Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Juiz de Fora

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa conquista.

Aos meus pais, Sônia e Lunei, e as minhas irmãs, Amanda e Wanessa, pelo apoio, paciência e carinho de sempre.

À Dora, pela orientação, dedicação, paciência e pela confiança, além da grande amizade.

Aos meus grandes amigos Mellina, Nelson e Brenda que sempre estiveram dispostos a me ajudar em tudo que eu precisei.

Aos amigos do grupo de pesquisa NEEM da UFJF, principalmente Nelson e Vanessa.

Aos funcionários do Departamento de Química, Fernando e Hilda.

Aos alunos do Grupo de Protozoologia do Mestrado em Comportamento Animal da UFJF pela enorme ajuda durante as coletas das amostras realizadas: Marcão, Ralf, Alissa, Raquel e, principalmente, à Bianca.

Ao professor Mauro e à Camila que me auxiliaram no início do trabalho.

À Ingrid e à Rafaela, que além da amizade, contribuíram para a realização do trabalho.

Ao Lucas, do grupo NAGEA/UFJF, pela construção dos mapas da localização das amostras.

Aos professores Renato e Denise e aos amigos do NUPIS: Carla, Marcos, Diego, Vanézia, Gilvânia, Alessandra, Camila, Ângela, William, Thaís, Wesley e Daniel.

Aos amigos do grupo de Química Analítica: Fernando e Adriana.

A todos os professores do Departamento de Química da UFJF pelos ensinamentos.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPEMIG e PROPESQ/UFJF pelo apoio financeiro.

*Dedicado aos meus
pais e as minhas
irmãs pelo incentivo e
carinho.*

RESUMO

Os esteróis fecais são considerados importantes indicadores de contaminação fecal em ambientes aquáticos. São compostos orgânicos hidrofóbicos e encontram-se associados ao material particulado e podem ser preservados por um longo tempo com biodegradação pouco significativa. As relações entre o coprostanol e os demais esteróis encontrados no meio ambiente são importantes para confirmar a presença de esgoto doméstico em ambientes aquáticos.

O presente trabalho desenvolveu uma metodologia analítica para extração, separação e determinação dos esteróis coprostanol, epicoprostanol, colesterol, colestanol e sitosterol em amostras de sedimento. Em seguida, aplicou-se o método em amostras de sedimentos coletadas em 6 córregos da cidade de Juiz de Fora.

O método de análise dos 5 esteróis foi otimizado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano (C-18) com detecção na região do ultravioleta. Para otimizar o processo de separação dos esteróis por HPLC, a composição e o fluxo da fase móvel por eluição isocrática foram otimizados, assim como o comprimento de onda de detecção. Como os esteróis não possuem absorvidade molar nessa região do espectro, houve a necessidade de realizar o processo de derivatização. Para isso, foram testados dois reagentes derivatizantes para aumentar a sensibilidade do método. Desse modo, pode-se separar e quantificar os 5 esteróis fecais.

Ao concluir essa etapa, aplicou-se essa metodologia para os estudos de tratamento de amostra. O resultado desse estudo permitiu percentuais adequados de recuperação dos analitos. Após o tratamento da amostra, realizou-se o procedimento de derivatização otimizado dos extratos para posterior análise por HPLC.

Os níveis de concentração de coprostanol nas amostras de sedimento analisadas variaram entre 0,0050 e 14,48 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Com exceção da amostra do córrego Fazenda Floresta, todas as outras foram consideradas contaminadas por fezes utilizando os parâmetros e critérios de avaliação para esse tipo de contaminação.

Palavras-chave: coprostanol, cloreto de benzoíla e HPLC.

ABSTRACT

The fecal sterols are considered important indicators of fecal contamination in aquatic environments. Organic compounds are hydrophobic and are associated with the particulate material and can be preserved for a long time with negligible degradation. The relationships between coprostanol and other sterols found in the environment are important to confirm the presence of domestic sewage into aquatic environments.

The present work developed an analytical method for extraction, separation and determination of sterols coprostanol, epicoprostanol, cholesterol, cholestanol and sitosterol in sediment samples. Then applied the method in sediment samples collected from six streams in the city of Juiz de Fora.

The method of analysis of the five sterols was optimized (High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using reverse phase chromatography column octadecylsilane (C-18) with detection in the ultraviolet region. To optimize the separation of sterols by HPLC, the composition and flow of mobile phase for isocratic elution were optimized, as well as the wavelength of detection. Because sterols are not molar absorptivity in this spectral region, it was necessary to make the process of derivatization. For this, we tested two derivatizing reagents to increase the sensitivity of the method. Thus, it can separate and quantify the five fecal sterols.

When you complete this step, we applied this methodology for studies of treatment samples. The result of this study allowed percentage recovery of analytes suitable. After treatment the sample was held optimized the procedure for derivatization of the extracts for analysis by HPLC.

The concentrations of coprostanol in the sediment samples analyzed varied between 0.0050 and 14.48 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Except for the sample stream Farm Forest, all others were considered contaminated by feces using the parameters and evaluation criteria for this type of contamination.

Keywords: coprostanol, benzoyl chloride and HPLC

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Estrutura básica dos esteróis	4
FIGURA 2: Transformação do colesterol para colestanol e coprostanol.....	5
FIGURA 3: Estrutura dos esteróis estudados	8
FIGURA 4: Fotos dos locais de coleta: córregos Tapera (à esquerda) e Humaitá (à direita)	17
FIGURA 5: Amostra de sedimento de córregos armazenado em recipientes de alumínio.....	18
FIGURA 6: Mapa com a localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de sedimento.....	19
FIGURA 7: Ilustração representando a calibração da coluna para eluição dos compostos estudados com diclorometano e metanol (1:1)	22
FIGURA 8: Fluxograma representando o tratamento 1	24
FIGURA 9: Fluxograma representando o tratamento 2	24
FIGURA 10: Fluxograma do processo de derivatização dos esteróis.....	28
FIGURA 11: Esquema de preparação das soluções padrão mistura (Mix) dos esteróis derivatizados para a curva analítica.....	32
FIGURA 12: Esquema da reação de derivatização entre colesterol e cloreto de benzoíla.....	35
FIGURA 13: Esquema da reação de derivatização entre colesterol e cloreto de benzoíla.....	36
FIGURA 14: Cromatogramas obtidos para eluição na coluna RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5	

μm): **(A)** esteróis nitrobenzoilados, fase móvel MeOH/Isopropanol/ H_2O (50:45:5), fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 254 \text{ nm}$; **(B)** esteróis benzoilados, fase móvel: 100% MeOH, fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detecção em 230 nm 37

FIGURA 15: Cromatogramas obtidos para eluição na coluna RP C18 ZORBAX ODS ($150,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); coluna de guarda ZORBAX ODS ($12,5 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$): **(A)** esteróis nitrobenzoilados em diferentes temperaturas, fase móvel MeOH/Isopropanol/ H_2O (50:45:5), fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detecção em 254 nm ; **(B)** esteróis benzoilados em diferentes temperaturas, fase móvel 100% MeOH, fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detecção em 230 nm 38

FIGURA 16: Representação do esquema otimizado para reação de derivatização dos padrões de esteróis para análise por HPLC com detecção no UV.....42

FIGURA 17: Cromatograma do gradiente exploratório entre H_2O e THF, para a injeção da solução mistura padrão dos 5 esteróis derivatizados ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ na forma de esterol), detecção em 230 nm em coluna de fase reversa C18, fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. 44

FIGURA 18: Cromatograma do gradiente exploratório entre H_2O e metanol, para a injeção da solução mistura padrão dos 5 esteróis derivatizados ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ na forma de esterol), detecção em 230 nm em coluna de fase reversa C18, fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$44

FIGURA 19: Cromatograma obtido para eluição da solução padrão mistura dos 5 derivados benzoilados dos esteróis (concentrações do coprostanol igual $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e dos demais esteróis igual a $100,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ na forma de esterol), em coluna de fase reversa C18, fluxo de $1,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tempo total de análise de 26 minutos em diferentes comprimentos de onda: **(A)** de 220 a 240 nm e **(B)** de 226 a 234 nm49

FIGURA 20: Cromatograma obtido para eluição da da solução padrão mistura dos 5 derivados benzoilados dos esteróis ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ na forma de esterol), detecção em 230 nm em coluna de fase reversa C18, fluxo de $1,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tempo total de análise de 26 minutos.....50

FIGURA 21: Curvas analíticas preparadas em triplicata dos esteróis bezoilados nas concentrações 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 mg.L ⁻¹ (expressas na forma de esterol).	51
FIGURA 22: Gráficos de análise de resíduos para as curvas analíticas dos esteróis estudados.....	54
FIGURA 23: Fluxograma da metodologia analítica utilizada para determinação de esteróis fecais em amostras de sedimento por HPLC.....	61
FIGURA 24: Cromatogramas: (A) solução padrão mistura dos 5 esteróis benzoilados 100 mg.L ⁻¹ , (B) amostra córrego Humaitá (ponto 3) e (C) amostra Campo Grande (ponto 1). Coluna Zorbax ODS (4,6 mm x 150,0 mm, 5 µm), coluna de guarda ZORBAX ODS (4,6 mm x 12,5 mm, 5 µm), coluna de guarda ZORBAX ODS (4,6 mm x 12,5 mm, 5 µm), fase móvel: MeOH/THF/H ₂ O (83:9:8), fluxo 1,7 mL.min ⁻¹ , detecção em 230 nm.....	64
FIGURA 25: Percentual de matéria orgânica extraída das amostras de sedimento .	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Critérios e parâmetros de avaliação da contaminação por esgoto utilizando esteróis como indicadores de contaminação fecal.....	8
TABELA 2: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de sedimentos nos córregos afluentes do Rio Paraibuna na cidade de Juiz de Fora coletadas no ano de 2010.....	18
TABELA 3: Valores médios de áreas dos picos dos compostos (n=2) derivatizados nas condições de reação realizadas em ultrassom e em repouso, em temperatura ambiente.....	39
TABELA 4: Média dos valores das áreas (n=2) dos picos obtidos nos cromatogramas para derivatização do colesterol com BzCl empregando diferentes solventes para extração dos derivados com os valores de DPR.....	41
TABELA 5: Composição de fase móvel ternária testados.....	46
TABELA 6: Valores de fator de separação (α) e do tempo de análise para cada composição de fase móvel estudada obtidas para a mistura padrão dos esteróis benzoilados (100 mg.L ⁻¹ na forma de esterol) analisada por HPLC com detecção em 230 nm.....	47
TABELA 7: Parâmetros de separação obtidos para a mistura padrão dos esteróis benzoilados (100 mg.L ⁻¹ na forma de esterol) eluída no HPLC com metanol/água/tetraidrofurano (83:8:9 v/v), fluxo de 1,7 mL.min ⁻¹ , detecção em 230 nm.....	48
TABELA 8: Tabela de análise da variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados.....	52
TABELA 9: Valores de F calculado e tabelado para análise da variância para cada analito a um nível de 95% de confiança.....	53

TABELA 10: Limites de detecção e quantificação do método (expressos em mg.L ⁻¹) e repetitividade obtidos para uma massa da amostra Represa de São Pedro de 10,0 g (n =5).....	55
TABELA 11: Limites de detecção e quantificação do método (expressos em µg.g ⁻¹) e repetitividade obtidos para uma massa da amostra Represa de São Pedro de 10,0 g (n =5).....	56
TABELA 12: Percentuais de recuperação médios e desvios padrões relativos obtidos para tratamento 2 das amostras fortificadas com 80,0 mg.L ⁻¹ de cada padrão de esterol (sem realizar a etapa de purificação dos extratos)	57
TABELA 14: Percentuais médios de recuperação e desvios padrões relativos alcançados para amostra e branco fortificados com mistura padrão dos esteróis (60,0 mg.L ⁻¹).....	58
TABELA 15: Concentrações (µg.g ⁻¹ peso seco) de esteróis nas amostras de sedimento de córregos da cidade de Juiz de Fora, coletadas em julho e outubro de 2010.	63
TABELA 16: Resultado da avaliação realizada pelos critérios e parâmetros de que avaliam a contaminação fecal nas amostras analisadas.....	65
TABELA 17: Comparação dos níveis de concentração de coprostanol obtidos em amostras de sedimentos lacustres de diferentes áreas de estudo.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	Argônio
B	Branco
BF	Branco fortificado
BzCl	Cloreto de benzoíla
C-18	Coluna cromatográfica octadecilsilano
CESAMA	Companhia de Saneamento Ambiental de Juiz de Fora
Col	Colestanol
Cop	Coprostanol
Cor	Colesterol
DCM	Diclorometano
DPR	Desvio padrão relativo
Epi	Epicoprostanol
ETE	Estação de tratamento de esgoto
EUA	Estados Unidos da América
GC-FID	Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama
GC-MS	Cromatógrafo a gás acoplado a um espectômetro de massas
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Matriz
MeOH	Metanol
MF	Matriz fortificada
MIX	Mistura padrão
MOE	Matéria orgânica extraída
MQ_{ep}	Média quadrática do erro puro
MQ_{faj}	Média quadrática da falta de ajuste
NA_2SO_4	Sulfato de sódio anidro

NAGEA	Núcleo de Análise Geo-Ambiental
NBC	Cloreto de p-nitrobenzoíla
NOAA	“National Oceanic Atmospheric Administration, USA”
ONU	Organização das Nações Unidas
PNUD	Projeto das Nações Unidas
RP	Coluna de fase reversa
Sit	Sitosterol
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SQ_{ep}	Soma quadrática do erro puro
SQ_r	Soma quadrática dos resíduos
SQ_{reg}	Soma quadrática da regressão
THF	Tetraidrofurano
U.S. EPA	“United States Environmental Protection Agency”
US	Ultrassom
UV	Ultravioleta
α	Fator de separação
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL EM AMBIENTES AQUÁTICOS	3
1.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS PARA TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DOS ESTERÓIS.....	9
1.3.1. Tratamento das amostras.....	9
1.3.1.1. Extração das amostras.....	9
1.3.1.2. Purificação dos extratos	10
1.3.2. Métodos de análise	11
1.4. ÁREA DE ESTUDO.....	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODO	15
3.1. LIMPEZA DO MATERIAL.....	15
3.2. MATERIAL E REAGENTES	15
3.3. SOLUÇÕES PADRÃO	16
3.4. AMOSTRAGEM.....	16
3.4.1. Localização dos pontos	17
3.5. PREPARO DAS AMOSTRAS	20
3.6. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	20

3.6.1. Tratamento 1 (etapas de extração e purificação)	21
3.6.1.1. Teste para eluição dos compostos	22
3.6.2. Tratamento 2	23
3.7. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS	24
3.8. DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA EXTRAÍDA (MOE)	25
3.9. REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.....	25
3.9.1. Processo de reação de derivatização.....	26
3.9.2. Extração líquido-líquido	27
3.10. OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR HPLC	29
3.10.1. Fase móvel.....	29
3.10.2. Seleção do comprimento de onda (λ) de análise.....	30
3.11. CURVA ANALÍTICA	30
3.11.1. Avaliação do método da curva analítica	33
3.12. LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	33
3.13. CONTROLE DE QUALIDADE DO MÉTODO	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	35
4.1. REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.....	35
4.1.1. Processo de reação de derivatização.....	36
4.1.2. Solvente utilizado na extração líquido-líquido	40
4.2. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO POR HPLC.....	42
4.2.1. Seleção da coluna cromatográfica	42
4.2.2. Otimização da fase móvel	43

4.2.3. Comprimento de onda da análise.....	48
4.3. CURVAS ANALÍTICAS.....	50
4.3.1. Análise da variância	52
4.3.2. Análise de resíduos.....	53
4.3.3. Linearidade do método.....	54
4.4. LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO E REPETITIVIDADE	55
4.5. TESTE PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS PARA A PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS.....	56
4.6. ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS	56
4.7. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE DO MÉTODO.....	58
4.8. METODOLOGIA OTIMIZADA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS POR HPLC.....	59
5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTOS	61
5.1. PERCENTUAL DE MATÉRIA ORGÂNICA EXTRAÍDA (% MOE)	67
6. COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS	67
7. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	71

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

A qualidade da água potável tem sido um fator determinante para o bem estar humano. No decorrer dos milhares de anos, a população aumentou significativamente e as emissões de poluentes decorrentes das atividades humanas também aumentaram, deteriorando os recursos hídricos indispensáveis à vida (ROCHA et al., 2006).

A poluição é uma alteração de alguma qualidade ambiental provocada pelo ser humano, para a qual a comunidade exposta é incapaz de neutralizar os efeitos negativos, sendo identificado algum tipo de risco. Mas nem toda alteração ecológica pode ser considerada poluição, algumas vezes a palavra contaminação é utilizada equivocadamente no sentido de poluição (ROCHA et al., 2006).

A contaminação é a presença de substâncias estranhas ao meio. No entanto, se estas substâncias não alterarem as relações ecológicas ali existentes ao longo do tempo, esta contaminação não é considerada uma forma de poluição (ROCHA et al., 2006).

As principais fontes de poluição têm origem nas atividades humanas, sendo que a poluição por esgoto representa a principal fonte de contaminação da água. Esse tipo de poluição tem como principal consequência a transmissão de doenças bacterianas e virais causadas por agentes infecciosos, que são transportados pela água, na população que não tem acesso à água potável. Cólera, pólio e hepatite são algumas doenças que podem ser transmitidas em ambientes aquáticos poluídos (MANAHAN, 2004; GRASSI, 2001).

O lançamento de esgotos domésticos, com ou sem tratamento prévio, em ambientes aquáticos afeta a qualidade da água do sistema receptor, provocando redução do oxigênio dissolvido, aumento da turbidez, mudanças do pH, entre outros efeitos, e tem reflexos sobre a manutenção das condições ideais para a sobrevivência dos organismos e sobre a saúde humana (CARREIRA *et al.*, 2001).

Em todo o planeta, 2,4 bilhões de pessoas despejam seus esgotos sem qualquer tratamento prévio, no solo ou em corpos d'água que passem perto de suas

casas, porque não possuem acesso a um sistema de coleta de esgoto (Ambiente Brasil, 2003).

Segundo dados do relatório de 2008 do SNIS (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento), 97,6% da população brasileira têm acesso à água potável e 76,9% possuem serviços de esgoto em regiões urbanas. A rede coletora chega a 50,6% da população urbana e o índice de tratamento de esgoto gerado é de somente 34,6%. Sendo assim, a maior parte do volume de esgoto gerado não recebe nenhum tratamento e é despejada desse modo em rios, represas ou no oceano.

Desta maneira, tão ou mais importante que a questão envolvendo a quantidade de água disponível, apresenta-se também a questão da qualidade da água disponível, que tem se deteriorado de forma crescente, especialmente nos últimos 50 anos (GRASSI, 2001).

O Projeto do Milênio das Nações Unidas foi instituído em 2002 para desenvolver um plano de ação concreta para que o mundo reverta o quadro de pobreza, fome e doenças opressivas que afetam bilhões de pessoas. A Força-tarefa sobre Água e Saneamento é uma das 10 Forças-tarefa do Projeto Milênio e tem como meta diagnosticar os principais impedimentos ao alcance dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio e a apresentar recomendações de como superar os obstáculos, colocando as nações no caminho certo para atingir as metas até 2015 (PNUD, 2009).

De acordo com esta Força-tarefa, a falta de acesso a água e saneamento obstrui esforços para reduzir a pobreza em países em desenvolvimento, cujo objetivo principal é reduzir pela metade o número de pessoas sem acesso à água e saneamento ao longo das próximas décadas. Além disso, os países precisam melhorar a gestão da água, para proteger o meio-ambiente e usar seus recursos hídricos de forma eficaz (PNUD, 2009).

Muitos compostos químicos, especialmente os metais pesados e os compostos orgânicos hidrofóbicos, que são introduzidos em corpos d'água por meio do esgoto, apresentam a tendência de se depositarem nos sedimentos e a partir deles os compostos tóxicos podem ser transferidos para os organismos que habitam essa região. Por esse motivo os sedimentos são de grande importância ambiental (BAIRD, 2002).

Os sedimentos são as camadas de partículas minerais e orgânicas que se encontram em contato com a parte inferior dos corpos de água natural, como lagos, rios e oceanos. São constituídos por partículas de grande variedade de tamanho, formas geométricas e composição química, que são transportados por água, ar ou gelo dos pontos de origem nos ambientes terrestres e a proporção dos minerais e da matéria orgânica varia substancialmente em função do local (BICUDO e BICUDO, 2007; BAIRD, 2002).

Os sedimentos se depositam no fundo de corpos d'água por processos químicos, físicos e biológicos. O material que forma o sedimento pode ser constituído por argila, areia, matéria orgânica e outros materiais (MANAHAN, 2004).

Argila e areia provêm da descamação da costa dos corpos d'água. A matéria orgânica provem de fontes biológicas e combustíveis fósseis. As fontes biológicas podem ser plantas, animais e biomassa microbiana, incluindo materiais como celulose, lignina e colágeno, e também pela degradação de substâncias húmicas. As fontes de combustíveis fósseis incluem carvão, fuligem, coque, carvão vegetal e resíduos de petróleo, como asfalto (MANAHAN, 2004).

1.2. Bioindicadores de contaminação fecal em ambientes aquáticos

A avaliação da poluição por esgotos em ambientes aquáticos é de grande importância para a saúde pública, uma vez que com o crescimento demográfico e socioeconômico a demanda por água aumentou e a sua qualidade é de fundamental relevância.

A principal forma de detectar poluição por esgotos em ambientes aquáticos é através da presença de indicadores microbiológicos como *coliformes* fecais.

O exame bacteriológico mais comum para avaliação da qualidade microbiológica de águas consiste na determinação da presença de bactérias do grupo coliforme, dividido em bactérias fecais (ou intestinais) e não fecais. As primeiras vivem e se multiplicam no trato digestivo de animais de sangue quente (mamíferos e aves) e são eliminadas junto com as fezes. As não fecais são encontradas normalmente no solo (GUIMARÃES e NOUR, 2001).

Entretanto a análise de *coliformes* fecais encontra algumas limitações, incluindo baixo tempo de vida e pouca resistência a variações de temperatura.

Portanto, necessitam de análise logo após a coleta, sendo, muitas vezes, desvantajoso. Por esse motivo, um resultado negativo de *coliformes* fecais nem sempre garante a ausência de organismos prejudiciais ao meio (FROEHNER e MARTINS, 2008; MARTINS, 2001).

Uma forma mais confiável de analisar esse tipo de poluição é através de indicadores químicos como os esteróis fecais. Os esteróis são considerados importantes biomarcadores geoquímicos. Os biomarcadores são compostos orgânicos que, uma vez lançados no ambiente, têm sua integridade estrutural conservada e, portanto, a origem dos mesmos pode ser determinada (SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006; MUDGE e DUCE, 2005; LEEMING *et al.*, 1996).

Esteróis são compostos químicos lipofílicos, que pertencem ao grupo dos álcoois. Apresentam um grupo hidroxila na posição 3, o que lhes garante propriedades químicas semelhantes aos dos álcoois. A estrutura básica dos esteróis está representada na FIGURA 1.

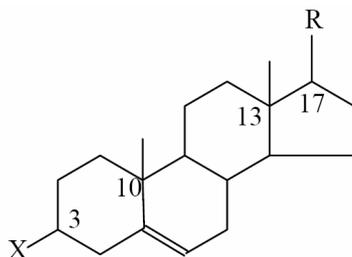


FIGURA 1: Estrutura básica dos esteróis

O coprostanol (5β -Cholestan- 3β -ol) é o principal esterol fecal encontrado em resíduos de esgoto. É formado no intestino de animais superiores como resultado da bioidrogenação do colesterol por bactérias. Nesse processo, o colesterol pode ser transformado em coprostanol e em outro esterol, o colestanol, mas a transformação em coprostanol é favorecida (MARTINS *et al.*, 2007; MUDGE e DUCE, 2005; GRIMALT *et al.*, 1990). Essa transformação está representada na FIGURA 2.

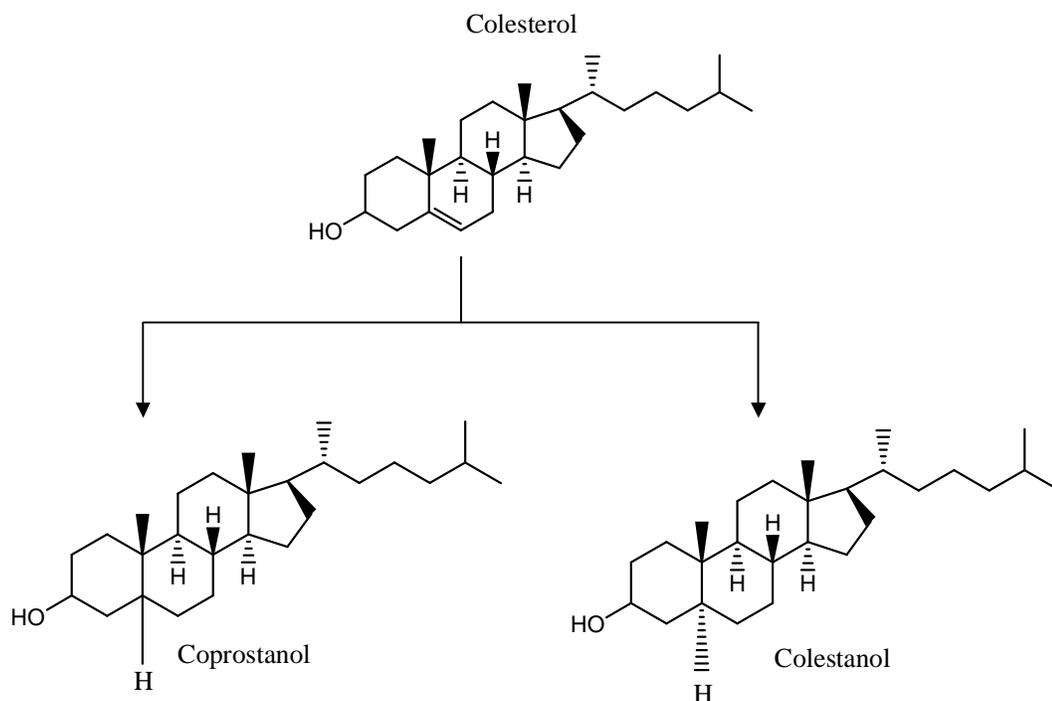


FIGURA 2: Transformação do colesterol para colestanol e coprostanol

Em média, humanos apresentam uma excreção *per capita* de 200 mg a 1 g de coprostanol por dia e que constituem aproximadamente 60% de esteróis totais encontrados em fezes humanas (WALKER *et al.*, 1982 *apud* GONZÁLEZ-OREJA e SAIZ-SALINAS, 1998 e LEEMING *et al.*, 1996).

Este esterol é um composto orgânico hidrofóbico e encontra-se associado ao material particulado. Desta forma, o mesmo pode ser incorporado aos sedimentos e preservado por um longo tempo (450 dias a 15°C) em ambiente anaeróbico, onde o mesmo apresenta biodegradação pouco significativa (SAVICHTCHEVA E OKABE, 2006; ISOBE, *et al.*, 2002; MUDGE e NORRIS, 1997).

Devido à especificidade de origem fecal do coprostanol, este composto tem sido usado como um confiável biomarcador de poluição fecal (COSTA *et al.*, 2011; FROEHNER *et al.*, 2010; MUDGE e BEBIANO, 1997; GRIMALT *et al.*, 1990).

Outro esterol também de origem fecal é o epicoprostanol (5 β -Cholestan-3 α -ol), isômero do coprostanol, mas que não está presente efetivamente nas fezes de animais superiores. Este é formado em ambientes aeróbios, quando o coprostanol se transforma nesse esterol. Essa transformação pode ocorrer também durante o processo de tratamento de esgotos, onde uma das etapas desse processo consiste

na aeração dos resíduos (MARTINS, R. F., 2008; MARTINS et al., 2007; MUDGE e SEGUÉL, 1999).

Os esteróis como colesterol, colestanol (5 α -Cholestan-3 β -ol) e β -sitosterol (24-etilcholest-5-em-3 β -ol) são conhecidos como esteróis de origem natural.

O colesterol é o esteroide mais abundante em toda a flora e a fauna. Por esse motivo, concentrações de colesterol podem ser derivadas de diversas fontes naturais como membrana celular de plantas, gorduras animais e, também, de fezes de fito e zooplâncton (MARTINS et al., 2008a e MUDGE e NORRIS, 1997).

O β -sitosterol é encontrado em plantas vasculares terrestres (MUDGE e LINTERN, 1999 e MUDGE e NORRIS, 1997). O colestanol também é encontrado em fezes de fito e zooplâncton, além de ser um produto formado por processos bacterianos em sedimentos (GRIMALT *et al.*, 1990).

Pequenas concentrações de coprostanol podem ser encontradas em sedimentos não contaminados por poluição fecal. Estes baixos níveis de concentração podem ser encontrados devido à redução do colesterol *in situ* (FIGURA 2) e pela presença de fezes de mamíferos marinhos ou terrestres. Deve-se considerar, que as chances desta redução acontecer são muito pequenas no meio ambiente, quando comparado a que ocorre no intestino de animais superiores (MARTINS, R. F., 2008 e GONZÁLEZ-OREJA e SAIZ-SALINAS, 1998).

Devido a estes fatos, a avaliação de poluição fecal somente pela concentração de coprostanol encontrada no meio ambiente foi questionada (GONZÁLEZ-OREJA e SAIZ-SALINAS, 1998; NICHOLS et al., 1996). Alguns autores propuseram, então, utilizar relações entre esse esteroide e os demais esteróis encontrados no meio ambiente para confirmar a presença de esgoto (MARTINS *et al.*, 2007; MUDGE e SEGUÉL, 1999; GONZÁLEZ-OREJA *et al.*, 1998; LEEMING e NICHOLS, 1996, VENKATESAN e SANTIAGO, 1989 *apud* LOURENÇO, 2003).

Segundo LEEMING e NICHOLS (1996), uma concentração de coprostanol acima de 9,0 $\mu\text{g. g}^{-1}$ é suficiente para considerar um sedimento altamente contaminado. Posteriormente, NICHOLS *et al.* (1996) considerou que um nível de concentração acima de 0,5 $\mu\text{g. g}^{-1}$ indica poluição fecal significativa. De uma maneira geral, há uma tendência de que os valores estabelecidos como critérios de avaliação sejam cada vez menores, para, desta forma, proteger os recursos hídricos disponíveis.

A relação coprostanol/colesterol é utilizada para indicar a presença de esgoto em sedimentos. Valores acima de 1,00 dessa relação indicam resultado positivo para contaminação fecal (MUDGE *et al.*, 1999).

A razão entre coprostanol e colestanol (coprostanol/coprostanol+colestanol) é mais uma relação para garantia de que a ocorrência de esteróis se deve à poluição fecal e não a fontes naturais. Valores entre 0,1 e 0,3 são característicos de ambientes não poluídos, onde o predomínio de colestanol é associado a fontes naturais. Valores entre 0,70 e 1,00 são característicos de ambientes contaminados por fezes. Quando a área estudada apresenta valores entre 0,30 e 0,70, utiliza-se um outro parâmetro de avaliação de contaminação fecal para a confirmação dos resultados (GRIMALT *et al.*, 1990).

A razão de epicoprostanol/coprostanol pode ser utilizada como indicador de tratamento ou não de esgotos. Isso porque durante o tratamento de esgoto, o coprostanol se transforma em seu isômero epicoprostanol. Valores menores de 0,20, o esgoto não sofreu tratamento e valores acima de 0,80, indica esgoto tratado (MUDGE e SEGUÉL, 1999).

O esterol β -sitosterol pode ser relacionado com o colesterol como mais um critério de avaliação. Se a razão colesterol/ β -sitosterol for próxima de zero, há indícios de que a matéria orgânica encontrada em sedimentos marinhos ou lacustres tem origem terrígena (HUANG e MEINSCHEIN, 1979 *apud* MUDGE e NORRIS, 1997).

Existem outras relações que avaliam contaminação por esgoto em ambientes aquáticos utilizando também outros esteróis. Porém, para desenvolver esse trabalho, foram utilizados os principais critérios e parâmetros para esse tipo de avaliação, utilizando os 5 esteróis estudados como indicadores de contaminação fecal.

As estruturas dos esteróis estudados estão representadas na FIGURA 3 e os principais critérios e parâmetros de contaminação por fezes encontram-se resumidos na TABELA 1.

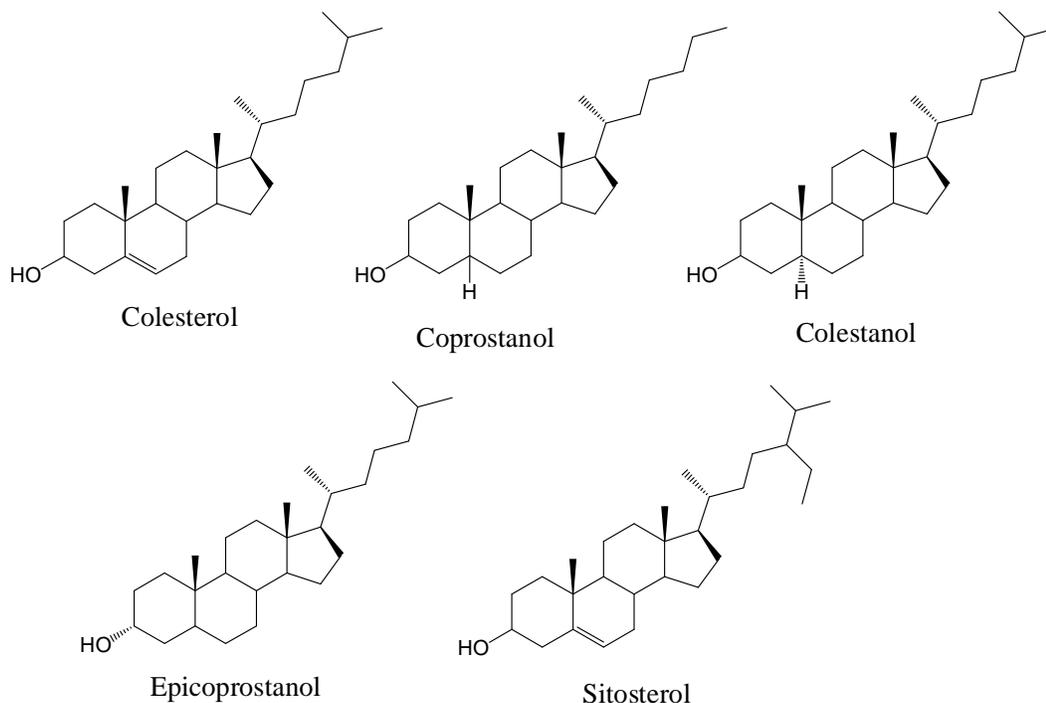


FIGURA 3: Estrutura dos esteróis estudados

TABELA 1: Critérios e parâmetros de avaliação da contaminação por esgoto utilizando esteróis como indicadores de contaminação fecal

Parâmetros de avaliação	Critérios
1) Concentração de coprostanol	$> 0,50 \mu\text{g.g}^{-1}$ → contaminado
2) Coprostanol/colesterol	$> 1,00$ → contaminado
3) Epicoprostanol/coprostanol	$< 0,20$ → introdução de esgoto sem tratamento $> 0,80$ → introdução de esgoto com tratamento
4) Coprostanol/(coprostanol+colestanol)	$0,00 - 0,30$ → não contaminado $0,30 - 0,70$ → confirmar o resultado com outro parâmetro $0,70 - 1,00$ → contaminado
5) Colesterol/ β -sitosterol	Próximo de zero → não contaminado

Assim como o coprostanol, todos os 5 esteróis estudados são hidrofóbicos e apresentam a tendência de se agregarem aos sedimentos. Os sedimentos como argila, silte, areia e substâncias húmicas atuam como trocadores catiônicos. Esses materiais adsorvem os compostos orgânicos por troca iônica. Esse mecanismo é **relativamente eficaz** e reduz, desta forma, a mobilidade iônica desses compostos

orgânicos. Quanto mais insolúveis em água forem, mais fortemente estarão ligados aos sedimentos (MANAHAN, 2004).

Dessa maneira, os esteróis tendem a se agregar aos sedimentos aquáticos, onde apresentam biodegradação pouco significativa em ambientes anóxicos (MARTINS *et al.*, 2008a; ISOBE *et al.*, 2002; NGUYEN *et al.*, 1995).

A granulometria dos sedimentos influencia a distribuição dos esteróis nos mesmos. Os sedimentos constituídos por partículas pequenas apresentam grande área efetiva e, com isso, adsorvem os compostos orgânicos presentes no ambiente. Já os sedimentos constituídos por partículas de maior tamanho, como os arenosos, demonstram uma reduzida capacidade de adsorção de compostos orgânicos (SOUZA, 2007 e MUNIZ *et al.*, 2004)..

1.3. Técnicas analíticas empregadas para tratamento das amostras e quantificação dos esteróis

1.3.1. Tratamento das amostras

Amostras ambientais, como sedimentos, usualmente requerem várias etapas de pré-tratamento antes de serem analisadas. Devido à complexidade desse tipo de amostra, geralmente, são necessárias as etapas de extração e purificação dos extratos (JAKUBOWSKA *et al.*, 2009).

1.3.1.1. Extração das amostras

A extração das amostras deve ser realizada para remover as substâncias interferentes e aumentar a concentração do analito de interesse para a análise cromatográfica (JAKUBOWSKA *et al.*, 2009).

A escolha do método de extração depende da matriz, pois há disponíveis diferentes métodos para cada tipo de amostra, seja ela sólida ou líquida. A escolha dos solventes utilizados nesse processo vai depender dos analitos, já que nenhum

solvente é universalmente aplicável a todos os grupos de compostos (JAKUBOWSKA *et al.*, 2009; U.S. EPA, 2007).

Esteróis são frequentemente extraídos de sedimentos por extração com solvente por aparelho de Soxhlet (MARTINS *et al.*, 2008a; GRIMALT *et al.*, 2002; MUDGE e BEBIANO, 1997; KAWAKAMI e MONTONE *et al.*, 2002; ou por ultrassom (HUSSAIN *et al.*, 2010; LOURENÇO, 2003; NGUYEN *et al.*, 1995).

A extração por Soxhlet extrai compostos orgânicos de matrizes sólidas e se caracteriza por ser um processo lento, que requer grandes quantidades de solventes e pode degradar termicamente os compostos mais lábeis (EMÍDIO e DÓREA, 2010).

A extração por ultrassom também é um procedimento para extração de compostos orgânicos de amostras sólidas, tais como solos, lamas e sedimentos. Esse processo garante um maior contato da matriz com o solvente (U.S. EPA, 1996).

Esse tipo de extração por ultrassom apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos, entre elas, redução do volume de solvente orgânico utilizado e menor tempo de extração (LOURENÇO, 2003). Tal processo também se mostra mais simples e mais seguro para o analista, uma vez que possibilita operação a temperatura e a pressão ambientes (LUQUE-GARCIA E CASTRO, 2003).

Alguns trabalhos que analisam esteróis fecais constataram a eficácia utilizando o método de extração por ultrassom, utilizando menor quantidade de solvente em um menor tempo (HUSSAIN, 2010; LOURENÇO, 2003). Sendo realizado em três etapas de sonicação, esse método garante uma maior eficiência da extração dos esteróis (U.S. EPA, 1996; NGUYEN *et al.*, 1995).

1.3.1.2. Purificação dos extratos

Outros compostos além dos esteróis estudados também são coextraídos nas condições de extração realizadas. A análise de esteróis em sedimentos por HPLC pode ser afetada por matéria orgânica extraída, ou seja, por outros contaminantes que podem coeluir com os analitos e outros compostos que podem causar picos interferentes. Para isso, um tratamento prévio para remover esses compostos

coextraídos pode ser necessário (HYOTYLAINEN e RIEKKOLA, 2007; KAWAKAMI e MONTONE, 2002).

Portanto, recomenda-se que seja realizado um processo de purificação dos extratos das amostras antes de serem analisados. A cromatografia por adsorção é a técnica mais utilizada para esse processo de purificação em análise de esteróis nas amostras de sedimentos. (U.S. EPA, 1996).

Para esse tipo de cromatografia, utiliza-se uma coluna recheada com um sólido (adsorvente) e uma fase móvel líquida, usando o mecanismo de adsorção. Os adsorventes mais empregados nesse tipo de procedimento são a sílica e a alumina (COLLINS *et al.*, 2009; HYOTYLAINEN e RIEKKOLA, 2007).

1.3.2. Métodos de análise

A técnica mais frequentemente utilizada para a determinação de esteróis em sedimentos é a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC-FID) (FROHNER *et al.*, 2009; KALAS *et al.*, 2009; SAIM *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2005; KAWAKAMI e MONTONE, 2002; MARTINS, 2001; GONZÁLEZ-OREJA e SAIZ-SALINAS, 1998; GRIMALT *et al.*, 1990) e cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS) (COSTA *et al.*, 2011; GILL *et al.*, 2010; GOURMELON *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2010; LIEBEZEIT e WOSTMANN, 2010; MARTINS *et al.*, 2010; VENKATESAN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2009; HJULSTROM e ISAKSSON, 2009; TYAGI *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009; BLOUNDI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; JARDÉ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2007; POERSCHMANN *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2007; BECK e RADKE, 2006; MUDGE e DUCE, 2005; LOURENÇO, 2003).

A técnica Cromatografia a Gás apresenta alta sensibilidade e há a necessidade de derivatização dos esteróis devido à dificuldade de volatilização desses compostos por apresentarem alto peso molecular.

O processo de derivatização consiste na transformação do analito em outra espécie mais conveniente ou mais fácil de ser analisada. Para a análise por cromatografia a gás, os esteróis são derivatizados utilizando o reagente N,O-bis(trimetil-sililtrifluor-acetamida)/trimetil-cloro-silano (BSTDA/TCMS). A reação

ocorre por 1 hora em banho-maria a 80°C. Desta forma, são gerados derivados voláteis dos esteróis (COSTA et al., 2011).

A técnica de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ainda é pouco utilizada para análise de esteróis, somente há dois relatos na literatura (HONG et al., 2007; PIOCOS e CRUZ, 2000).

No trabalho de HONG (2007), foram analisados os esteróis colesterol, coprostanol e sitosterol, além de ácidos biliares e outros lipídios, por Cromatografia Líquida acoplada a um detector de massas (LC-MS) em amostras de fezes de ratos. Já no trabalho de PIOCOS e CRUZ (2000), foi desenvolvida uma metodologia para análise somente do coprostanol sem aplicação em amostras reais. Este autor destaca o potencial de aplicação desta metodologia em outras amostras.

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de HPLC em fase reversa com detecção na região de ultravioleta, podendo ser uma técnica alternativa de análise dos esteróis fecais. A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa é recomendada para analitos não polares, como os esteróis, ou moderadamente polares (CIOLA, 2006).

Como os esteróis não apresentam capacidade de absorver radiação nessa região do espectro, o processo de derivatização foi realizado.

No Brasil, a maioria dos relatos encontrados na literatura sobre avaliação de contaminação fecal por esteróis são relacionados a ecossistemas estuarinos (COSTA et al., 2011; MARTINS et al., 2010; KALAS et al., 2009; CARREIRA et al., 2009; MARTINS *et al.*, 2008a; MARTINS *et al.*, 2008b; SANTOS *et al.*, 2008; MUNIZ *et al.*, 2006; CARREIRA *et al.*, 2004; MATER *et al.*, 2004).

Mas ainda há poucos estudos no Brasil sobre esse assunto em comparação ao mundo (GILL et al., 2010; GOURMELON et al., 2010; HUSSAIN et al., 2010; LIEBEZEIT e WOSTMANN, 2010; VENKATESAN et al., 2010; SINGH et al., 2010; CHOI et al., 2009; HJULSTROM e ISAKSSON, 2009; TYAGI et al., 2009; WU et al., 2009; BLOUNDI et al., 2008; HU *et al.*, 2008; LI et al., 2008; ZHANG et al., 2008; JARDÉ et al., 2007; POERSCHMANN et al., 2007; SHAH et al., 2007; BECKE e RADKE, 2006; MUDGE e DUCE, 2005; PENG *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-OREJA e SAIZ-SALINAS, 1998; MUDGE e LINTERN, 1998; MUDGE e BEBBIANO, 1997; LEEMING e NICHOLS, 1996; GRIMALT *et al.*, 1990).

Os trabalhos brasileiros envolvendo ecossistemas lacustres realizam os estudos com os esteróis como indicadores fecais em amostras de sedimento coletadas nos Rios Birigui (FROEHNER et al., 2010; FROEHNER et al., 2009; FROEHNER e MARTINS, 2008) e Capibaribe (FERNANDES et al., 1999) e na Lagoa do Pato (MARTINS, 2008; MARTINS et al., 2007).

1.4. Área de estudo

O Município de Juiz de Fora está contido na bacia do Médio Paraibuna, pertencente à bacia do rio Paraíba do Sul, e seu perímetro urbano é drenado por 156 sub-bacias de diversas dimensões (CESAMA, 2010).

O Rio Paraibuna percorre nove cidades: Antônio Carlos, Santos Dumont, Ewbanck da Câmara, Matias Barbosa, Simão Pereira, Belmiro Braga, Santana do Deserto, Chiador e Juiz de Fora com 70% do seu curso. Os afluentes dentro da zona urbana são: Ribeirão Ipiranga, Lamaçal, Matirumbide, Yung, São Pedro, Carlos Chagas, Humaitá, Ribeirão das Rosas, Facit, Artilharia, Tapera, Ribeirão dos Burros, Santa Cruz, Três Pontes e Ribeirão do Espírito Santo (CESAMA, 2010).

O rio recebe em seu leito grande volume de esgotos domésticos sem qualquer tratamento, além de esgoto não doméstico de alto grau de concentração e toxicidade, sendo considerado um rio “morto” entre a cidade de Juiz de Fora e a Barragem de Joasal (antiga Usina Quatro) (CESAMA, 2010).

Apenas 9,76% de todo o esgoto lançado no rio Paraibuna foi tratado em 2009, nas duas estações de tratamento de esgoto (ETE) que estão em funcionamento na cidade, ETE Barbosa Lage e ETE Barreira do Triunfo (Acessa.com, 2010).

O Rio Paraibuna é um importante recurso para a cidade de Juiz de Fora e para as demais cidades nas quais tem seu curso. A degradação da qualidade de suas águas ao longo dos últimos anos tem, portanto, impactos altamente negativos. A busca de alternativas para a localização de fontes de abastecimento de água para consumo humano, particularmente nas cidades de médio e grande portes, tem significado investimentos cada vez mais elevados (CESAMA, 2010).

Por isso, a análise de contaminação fecal apresenta fundamental importância para avaliar a qualidade de recursos hídricos de nossa cidade. Com o

desenvolvimento sócio-econômico e, conseqüentemente, aumento populacional das cidades, há a contaminação e degradação desses recursos, como já foi mencionado. O conhecimento do grau de poluição dos efluentes lançados em determinado corpo d'água, como rios, é importante ao estabelecimento de medidas controladoras de poluição de origem doméstica.

Foram selecionados seis córregos afluentes do Rio Paraibuna para estudo. Foram eles: córregos do Tapera, localizado na região Nordeste da cidade; córrego Matirumbide, na região leste; córrego da Fazenda Floresta, localizado na zona rural de Juiz de Fora e córregos Campo Grande, Humaitá e Carlos Chagas, localizados na região norte.

Com exceção do córrego da Fazenda Floresta, todos os pontos estudados apresentaram mau cheiro, lixo, águas escuras e descargas diretas de dejetos domésticos sem qualquer tratamento para descontaminação. Estas foram características marcantes desses pontos. O córrego da Fazenda Floresta é o único localizado em um ambiente mais afastado da cidade, portanto, foi o único que apresentou águas claras em um ambiente, aparentemente, limpo.

2. Objetivos

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica para identificação e quantificação dos esteróis colesterol, coprostanol, colestanol, epicoprostanol e β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta (UV) em amostras de sedimentos lacustres.

2.1. Objetivos específicos:

- Otimizar os parâmetros de separação dos esteróis por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV.
- Otimizar as condições para a extração dos esteróis.
- Otimizar a etapa de purificação dos extratos por cromatografia em coluna, avaliando-se o uso de diferentes eluentes.
- Otimizar o processo de derivatização dos esteróis.

- Determinar os esteróis em amostras de sedimentos dos principais afluentes do Rio Paraibuna

3. Material e Método

3.1. Limpeza do material

Todo o tipo de material utilizado nos procedimentos realizados, material metálico, de vidro ou de porcelana, foram previamente tratadas em laboratório. Foram deixados em banho de detergente alcalino por 8 horas. Feito isso, o material foi enxaguado em água corrente e por fim em água deionizada. Em seguida, o material foi seco em estufa (150°C) e armazenado em ambiente limpo para evitar a contaminação com poeira ou outros contaminantes. No momento da utilização, o material foi enxaguado com pequenas quantidades de solvente orgânico de forma a minimizar a possibilidade da inserção de contaminantes orgânicos nas análises.

3.2. Material e reagentes

Uma vez que se deseja analisar traços de compostos, todos os solventes empregados necessitam ter um alto grau de pureza para que não interfiram nas análises.

Dessa forma, foram utilizados apenas solventes grau HPLC em todos os procedimentos realizados, com exceção da piridina de grau P.A. Os solventes orgânicos utilizados foram diclorometano (DCM), metanol (MeOH), acetato de etila, n-hexano, isopropanol e tetraidrofurano (THF).

Os padrões de esteróis e os reagentes utilizados na reação de derivatização, cloreto de benzoíla e cloreto de p-nitrobenzoíla, possuem grau de pureza entre 95 e 99%.

A sílica-gel 70-230 mesh foi ativada em estufa a 120° C por 2 horas, resfriada em dessecador a vácuo e parcialmente desativada com 5% de água deionizada. Após esse tratamento, a sílica foi preservada em dessecador a vácuo e utilizada por

até 5 dias. O sulfato de sódio anidro, a lã de vidro e os recipientes descartáveis de alumínio utilizados nas coletas foram aquecidos a 400°C durante 4 horas para eliminar possíveis interferentes orgânicos (U.S. EPAa, 1996). Depois, o sulfato de sódio anidro e a lã de vidro foram armazenados em recipientes de vidro hermeticamente fechados. Os recipientes de alumínio foram envolvidos por papel alumínio.

3.3. Soluções padrão

As soluções padrão foram preparadas a partir de uma determinada massa de cada esteroide dissolvida em diclorometano. Em seguida, cada solução padrão dos esteróides foi derivatizada separadamente com o reagente adequado. A solução padrão mistura (Mix) foi preparada a partir da diluição da combinação das alíquotas de cada uma das soluções padrão individuais dos derivados dos esteróides. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20°C.

Os compostos colestanol, epicoprostanol e coprostanol possuem a mesma fórmula molecular, ou seja, são isômeros. Os três isômeros e os demais compostos estudados, sitosterol e colesterol, possuem estruturas similares. Por isso, possuem propriedades físicas e químicas bastante semelhantes.

Por esse motivo, alguns estudos nesse trabalho foram realizados utilizando solução mistura padrão de somente três esteróides (colesterol, colestanol e epicoprostanol) e outra utilizando mistura dos cinco compostos (colesterol, coprostanol, colestanol, sitosterol e epicoprostanol). Já que as propriedades químicas dos esteróides são semelhantes, os resultados dos testes seguiram as mesmas tendências para todos eles.

3.4. Amostragem

A metodologia adotada foi baseada em publicações das agências americanas U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) e National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA).

3.4.1. Localização dos pontos

A coleta das amostras foi realizada em cooperação com o grupo de pesquisa do Mestrado em Comportamento Animal (Protozoologia) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Conforme foi mencionado anteriormente, seis córregos da cidade de Juiz de Fora afluentes do Rio Paraibuna foram selecionados como pontos de coleta. As coletas de amostras de sedimentos nesses pontos foram realizadas nos meses de julho e outubro do ano de 2010. A primeira coleta aconteceu em julho e foi realizada no dia 15 desse mês, entre 8:00 e 12:00 h. A segunda coleta aconteceu no dia 14 outubro, sendo realizada nos mesmos horários da anterior. Todas as coletas foram realizadas em períodos de seca.

Em cada córrego, coletou-se apenas uma amostra de sedimento, tendo apenas um ponto de coleta.

Os pontos escolhidos para as coletas foram de acordo com as condições de acessibilidade e foram coletados em pontos preservados para garantir a integridade da amostra. A identificação dos locais foi feita por meio de fotografias e descrição de coordenadas geográficas dos mesmos. As fotos de dois pontos de coletas estão apresentadas na FIGURA 4.

As amostras foram coletadas e recolhidas em recipientes descartáveis de alumínio previamente tratadas em laboratório (FIGURA 5).



FIGURA 4: Fotos dos locais de coleta: córregos Tapera (à esquerda) e Humaitá (à direita)



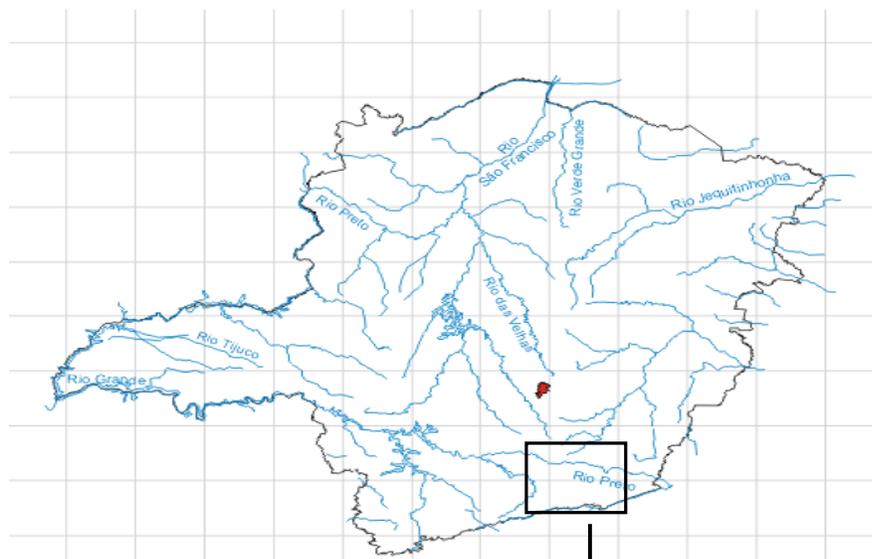
FIGURA 5: Amostra de sedimento de córregos armazenado em recipientes de alumínio

Na TABELA 2 encontram-se a identificação dos córregos juntamente com as coordenadas geográficas de cada ponto em que foram feitas as coletas.

O mapa hidrográfico de parte da cidade de Juiz de Fora com a localização dos pontos de coleta, juntamente com o mapa hidrográfico do estado de Minas Gerais são mostrados na FIGURA 6. Os mapas foram elaborados com dados do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), sendo a execução do Núcleo de Análise Geo-Ambiental (NAGEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

TABELA 2: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de sedimentos nos córregos afluentes do Rio Paraibuna na cidade de Juiz de Fora coletadas no ano de 2010

Pontos	Córrego	Bairro	Coordenadas Geográficas		Hora	Dia
1	Campo Grande	Barreira do Triunfo	S 21° 39' 50.0"	N 43° 19' 24.2"	9:27	14/10
2	Humaitá	Francisco Bernardino	S 21° 39' 50.0"	N 43° 23' 46.0"	11:45	15/07
3	Carlos Chagas	Carlos Chagas	S 21° 39' 50.0"	N 43° 23' 13.2"	12:00	14/10
4	Tapera	Santa Terezinha	S 21° 39' 50.0"	N 43° 16' 51.1"	10:15	15/07
5	Matirumbide	Bonfim	S 21° 39' 50.0"	N 43° 20' 43.1"	9:21	15/07
6	Floresta	Floresta	S 21° 39' 50.0"	N 43° 16' 51.1"	10:19	14/10



Mapa hidrográfico de Minas Gerais. Fonte: IBGE.

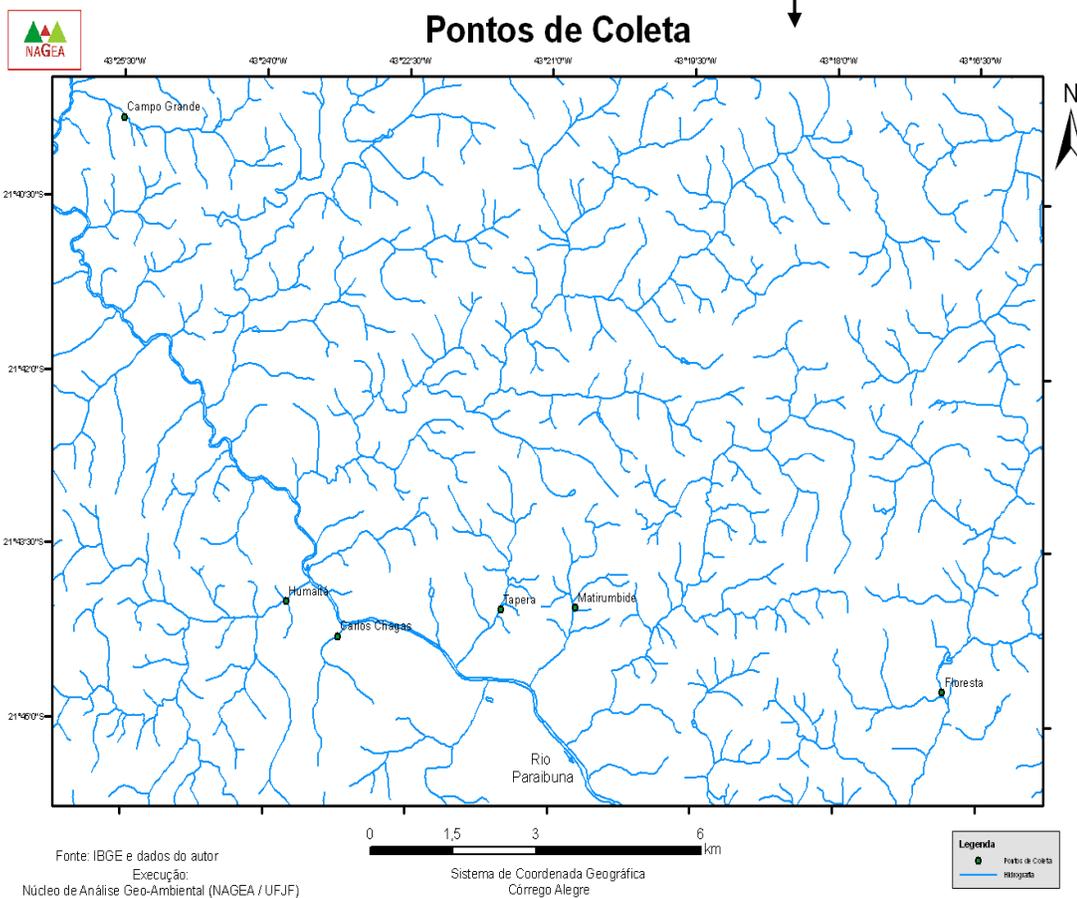


FIGURA 6: Mapa com a localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de sedimento

3.5. Preparo das amostras

As amostras foram conservadas a -20°C e posteriormente submetidas ao processo de secagem com temperatura controlada até no máximo 65°C (NOAA, 1998). Depois de secas, as amostras foram trituradas em gral e pistilo de porcelana visando à redução da granulometria do sedimento para uma melhor eficiência na extração, sendo logo em seguida armazenadas em frascos de vidro até o momento da análise.

3.6. Tratamento das amostras

Recomenda-se que o tratamento das amostras de sedimento para análise de esteróis consista em duas etapas: extração dos analitos e purificação dos extratos.

Porém, esse processo é longo e trabalhoso. Portanto, a melhoria da preparação da amostra em termos de confiabilidade, rapidez e sensibilidade deve ser considerada. O desenvolvimento mais rápido e com maior custo-efetivo são necessidades prementes para a realização desse processo (HYOTYLAINEN e RIEKKOLA, 2007).

Para isso, foram testados dois procedimentos para o tratamento das amostras. No primeiro tratamento testado, foram realizadas as etapas de extração dos analitos e purificação dos extratos, como foi recomendado. No segundo tratamento testado, foi realizada somente a etapa de extração dos analitos dos sedimentos sem proceder à etapa de purificação dos extratos.

O procedimento de tratamento das amostras foi otimizado a partir dos trabalhos de HUSSAIN (2010), LOURENÇO (2003) e NGUYEN (1995). O processo de extração dos esteróis em amostras de sedimentos para ambos os tratamentos de amostras testados foi realizado utilizando a técnica de ultrassom.

A seguir, são descritos os experimentos realizados para o estudo da otimização dos tratamentos de amostras propostos.

3.6.1. Tratamento 1 (etapas de extração e purificação)

Para a extração em ultrassom foram realizados experimentos empregando a mistura de solventes metanol e diclorometano na proporção de 1:1 (HUSSAIN, 2010). Neste estudo foi utilizado um banho ultrassônico Unique, modelo USC2850, com dois cristais piezelétricos, operando a frequência de 25 kHz e potência de 120 W.

Esses experimentos foram realizados da seguinte forma: 10 g de amostra (coletada na Represa de São Pedro) de sedimento fortificada conforme o item 3.7, foram pesados em balança analítica diretamente em frascos de vidro de aproximadamente 100 mL. A extração em ultrassom foi realizada por um tempo de 30 minutos. Após este tempo, os extratos foram recolhidos com auxílio de uma pipeta Pasteur para balões de fundo chato de 125 mL.

A extração foi realizada em três etapas de sonicação de 30 minutos cada. A primeira etapa foi realizada com um volume de 20 mL, a segunda e a terceira etapas, com 10 mL de solvente, totalizando 40 mL de solvente. Os extratos recolhidos em cada etapa foram combinados em balão de 125 mL e concentrados em evaporador rotativo a vácuo até um volume de aproximadamente 1 mL. Em seguida, esse extrato concentrado foi submetido ao processo de purificação.

Para realizar essa etapa de purificação dos extratos, foi utilizada a técnica de cromatografia por adsorção em coluna de sílica, utilizando como eluente a mistura de solventes diclorometano e metanol (1:1), utilizando o volume da mistura de solventes ideal para eluição dos esteróis otimizado conforme descrito no item a seguir, 3.6.1.1.

Foi utilizada uma coluna de vidro (0,5 cm de diâmetro interno) com torneira de teflon, contendo uma primeira camada de lã de vidro, seguida de 2 g de sílica gel, ativada e parcialmente desativada (item 3.2), e sobre essa última, foi adicionada uma camada superior de sulfato de sódio anidro, em quantidade correspondente a 0,5 cm de altura da coluna.

Depois de concluir essa etapa, os extratos recolhidos foram derivatizados, conforme a condição otimizada e analisados por HPLC.

3.6.1.1. Teste para eluição dos compostos por cromatografia em coluna

Para determinar o volume ideal dos solventes para a eluição dos compostos por cromatografia em coluna, foi realizado o procedimento que consistiu no preparo de duas colunas contendo sílica e sulfato de sódio anidro. Sendo, logo em seguida, uma delas eluída somente com a mistura de solventes diclorometano e metanol (1:1), denominada de branco e a outra eluída com a mistura de solventes diclorometano e metanol (1:1) adicionada da mistura padrão dos esteróis, denominada de branco fortificado.

O branco fortificado foi obtido com a eluição de 18 mL da mistura de solventes diclorometano e metanol (1:1), após a adição de 200 μL da solução mistura padrão dos três esteróis colesterol, colestanol e epicoprostanol ($1000,0 \text{ mg.L}^{-1}$) na coluna. Quatro frações consecutivas foram recolhidas: 12 mL (Fração 1) e 2 mL (Frações restantes 2, 3 e 4). Esse procedimento está ilustrado na FIGURA 7.

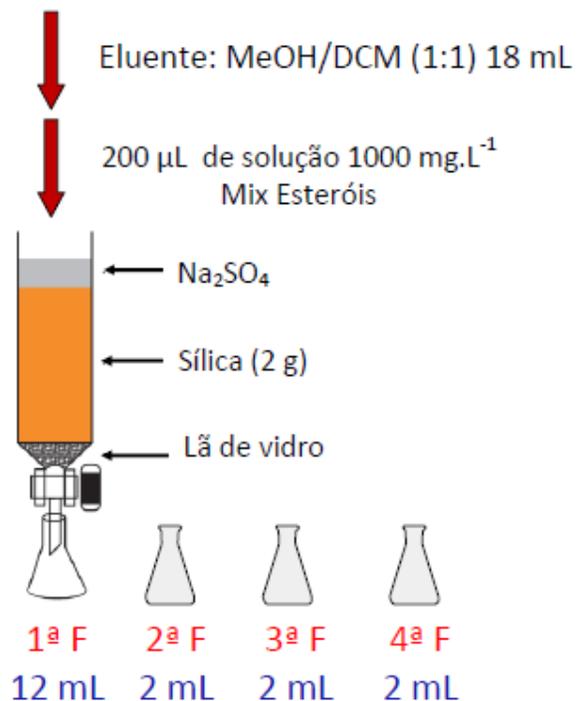


FIGURA 7: Ilustração representando a calibração da coluna para eluição dos compostos estudados com diclorometano e metanol (1:1)

Todas as frações recolhidas e o branco foram concentrados em evaporador rotativo, em seguida, derivatizados com o reagente adequado e, posteriormente, analisados no cromatógrafo a líquido.

3.6.2. Tratamento 2

Para esse teste foram utilizadas 10 g de amostras coletada na Represa de São Pedro fortificadas com solução mistura padrão conforme o item 3.7. Foi realizado, então, o processo de extração em ultrassom, utilizando o procedimento e os solventes como descrito no item 3.6.1. Após a extração, os extratos foram filtrados em pré-filtros de fibra de vidro, com porosidade de 1 μm e 25 mm de diâmetro, para retirar outras partículas. Em seguida foram levados ao evaporador rotativo para redução do volume. Em seguida, foram derivatizados, conforme a condição otimizada para esse procedimento e analisadas por HPLC.

Os dois procedimentos de tratamento das amostras estudados estão esquematizados nas FIGURAS 8 e 9.

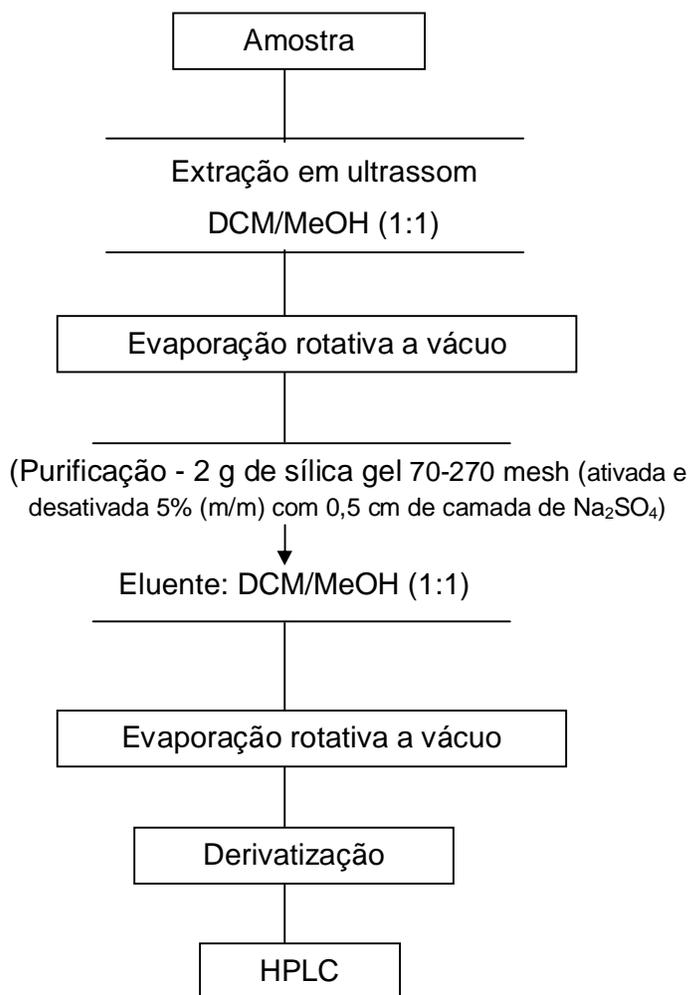


FIGURA 9: Fluxograma representando o tratamento 1

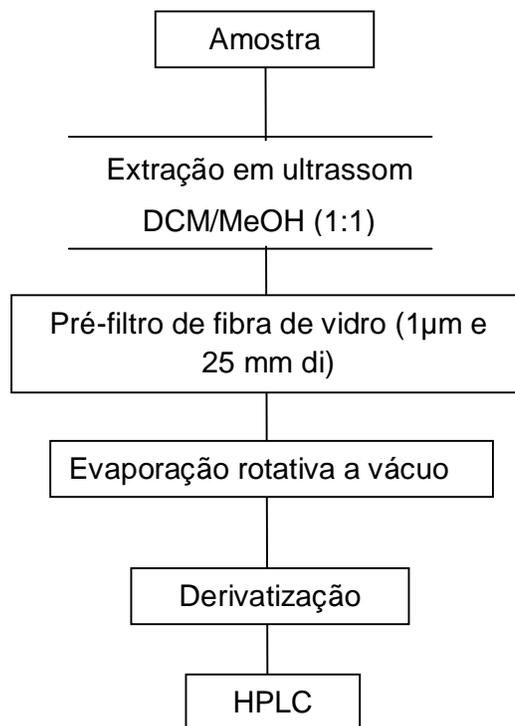


FIGURA 8: Fluxograma representando o tratamento 2

3.7. Estudo de recuperação das amostras fortificadas

A recuperação dos métodos de tratamento de amostra testados foi avaliada mediante a extração e análise de réplicas da amostra coletada na Represa de São Pedro adicionadas de 160 µL do Mix de esteróis (colesterol, epicoprostanol e colestanol) 1000,0 mg.L⁻¹ denominadas de amostras fortificadas, de forma a se obter nos extratos finais 80,0 mg.L⁻¹ dos padrões de esteróis. Cada tratamento de amostra foi testado em duplicata e teve como objetivo avaliar a metodologia analítica utilizando os dois procedimentos de tratamento de amostra estudados.

Desse modo, pôde-se avaliar qual procedimento de tratamento de amostra seria adotado para as análises de esteróis nas amostras de sedimentos coletadas.

Utilizou-se o teste *t* para comparar médias utilizando os dois procedimentos de tratamento de amostra testados, em um nível de confiança de 95%.

3.8. Determinação da matéria orgânica extraída (MOE)

Os extratos obtidos após o processo de extração das amostras analisadas foram concentrados até 10,0 mL em evaporador rotativo a vácuo. Desta solução foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para recipientes de alumínio, previamente pesados. Em seguida, os recipientes contendo as alíquotas foram levados ao dessecador a vácuo até a evaporação total do solvente e obtenção dos valores de massa constante nos resíduos obtidos. A outra porção do extrato (9,0 mL) foi concentrada até cerca de 1,0 mL e submetida à análise dos esteróis conforme metodologia estabelecida. O teor de MOE, expressa na forma de percentual, foi determinado conforme a equação 3.

$$\text{MOE (\%)} = \frac{[\text{Mr}_{(g)} \times \text{Vext}] \times 100}{\text{Ma}_{(g)} \times \text{Va}} \quad (\text{Equação 3})$$

MOE (%): Percentual de matéria orgânica extraída

Mr: Massa do resíduo após evaporação do solvente (g)

Vext: Volume total do extrato (mL)

Ma: Massa da amostra (g)

Va: Volume da alíquota retirada para determinação da MOE (mL)

3.9. Reação de derivatização

Os esteróis não apresentam capacidade de absorver radiação na região do ultravioleta, por esse motivo, houve a necessidade de realizar o processo de derivatização dos esteróis. A fim de se obter maior intensidade de sinal dos esteróis na região do ultravioleta e com isso, maior sensibilidade do método, dois reagentes

derivatizantes foram testados: cloreto de benzoíla (BzCl) e cloreto de p-nitrobenzoíla (NBC).

Além de estudar a reação de derivatização dos esteróis utilizando dois reagentes, cloreto de benzoíla e cloreto de p-nitrobenzoíla, alguns parâmetros desse processo também foram estudados. Foram eles: realização do processo de derivatização em ultrassom ou em repouso, tempo de reação e solventes utilizados na extração líquido-líquido após a reação.

3.9.1. Processo de reação de derivatização

Para otimizar o processo de reação de derivatização, três procedimentos diferentes foram testados e estão descritos a seguir.

O **primeiro estudo** realizado para a otimização do processo de derivatização foi realizado utilizando os dois reagentes cloreto de benzoíla e cloreto de p-nitrobenzoíla, seguindo, primeiramente, o mesmo procedimento descrito por ABIDI (2004).

A reação foi testada, com os padrões de colesterol, epicoprostanol e colestanol da seguinte forma: em tubos de ensaio foram adicionados 0,04 mg de cada esterol, 800 µL de piridina e 200 µL de cloreto de benzoíla em um tubo de ensaio e no outro tubo, 800 µL de piridina e 500 mg de cloreto de p-nitrobenzoíla. Os tubos foram fechados e deixados em repouso à temperatura ambiente por 12 horas.

Após esse tempo, foi realizada a extração líquido-líquido nos dois tubos de ensaio, utilizando 5 mL da solução de HCl 0,01 mol/L e 6 mL de solvente n-hexano. A fase orgânica de cada tubo de ensaio foi recolhida e analisada por HPLC. A eficiência da reação foi avaliada comparando-se as áreas obtidas para os picos dos esteróis derivatizados com cloreto de benzoíla e cloreto de p-nitrobenzoíla.

Para a realização do **segundo estudo**, foram adicionados a 0,02 mg de cada esterol (epicoprostanol, colestanol e colestanol), 400 µL de piridina e 100 µL de cloreto de benzoíla e para os testes com cloreto de p-nitrobenzoíla, 400 µL de piridina e 250 mg de cloreto de p-nitrobenzoíla, em tubos de ensaio.

O tempo de reação foi fixado em 30 minutos e em um banho ultratermostático, variou-se a temperatura em 50, 65, 80 e 95°C. Depois de cessado esse tempo, foi realizada também a extração líquido-líquido (5 mL de HCl e 6 mL de

n-hexano) e a fase orgânica obtida para cada temperatura testada foi analisada por HPLC para comparar a eficiência da reação realizada com os dois reagentes derivatizantes, cloreto de benzoíla e cloreto de nitrobenzoíla, em termos de valores de área dos picos dos analitos dos derivados.

O **terceiro estudo** para otimização da reação de derivatização dos esteróis estudados, teve como objetivo principal comparar os dois tipos de procedimentos de reação: em repouso por 12 horas e no ultrassom, utilizando o reagente cloreto de benzoíla.

Os compostos utilizados nesse procedimento foram colesterol, epicoprostanol e colestanol. Esse teste foi realizado da seguinte maneira: em tubos de ensaios contendo a mesma quantidade de cada padrão, foram adicionadas quantidades excedentes de cloreto de benzoíla (200 μL) e de piridina (800 μL), obtendo-se uma concentração final de 200,0 mg.L^{-1} para cada analito, expressa na forma de esterol.

A mistura reacional foi levada ao ultrassom, onde variou-se o tempo de reação de 30 a 75 minutos. A reação também foi realizada em repouso por 12 horas, para comparar os resultados obtidos para essa condição de reação com os obtidos com a condição descrita anteriormente, em ultrassom. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Em seguida, foi realizada a extração líquido-líquido (5 mL de HCl e 6 mL de n-hexano) e a fase orgânica recolhida em cada tubo de ensaio, analisada por HPLC. As áreas obtidas dos picos dos analitos também foram comparadas nesse teste.

3.9.2. Extração líquido-líquido

Após realizar o processo de reação de derivatização, recomenda-se uma extração em solução ácida ou água e solvente orgânico imiscível em água (ABIDI, 2004; FITZPATRICK e SIGGIA, 1973).

Nesta etapa, foi avaliada a eficiência da extração dos derivados com os seguintes solventes orgânicos: acetato de etila, diclorometano e n-hexano, que foram selecionados para o estudo de acordo com a solubilidade dos derivados dos esteróis formados com o reagente cloreto de benzoíla nesses solventes.

Para realizar esse teste, foram adicionados 100 μL de cloreto de benzoíla e 400 μL de piridina a 200 μL de solução padrão de colesterol com concentração igual

a 1000 mg.L^{-1} . Após o tempo de 45 minutos de reação realizada em ultrassom, procedeu-se à extração líquido-líquido.

A extração foi realizada com a adição de 5 mL solução de HCl na solução contendo o produto da reação de derivatização. O solvente orgânico foi adicionado em 3 porções consecutivas de 2 mL. Após cada partição, a fase orgânica foi recolhida e transferida para um balão de fundo chato. As 3 porções de extratos foram combinadas e o volume reduzido em evaporador rotativo a vácuo. O resíduo obtido foi convenientemente diluído em isopropanol e analisado, nas mesmas condições, por HPLC. O processo de derivatização está esquematizado na FIGURA 10.

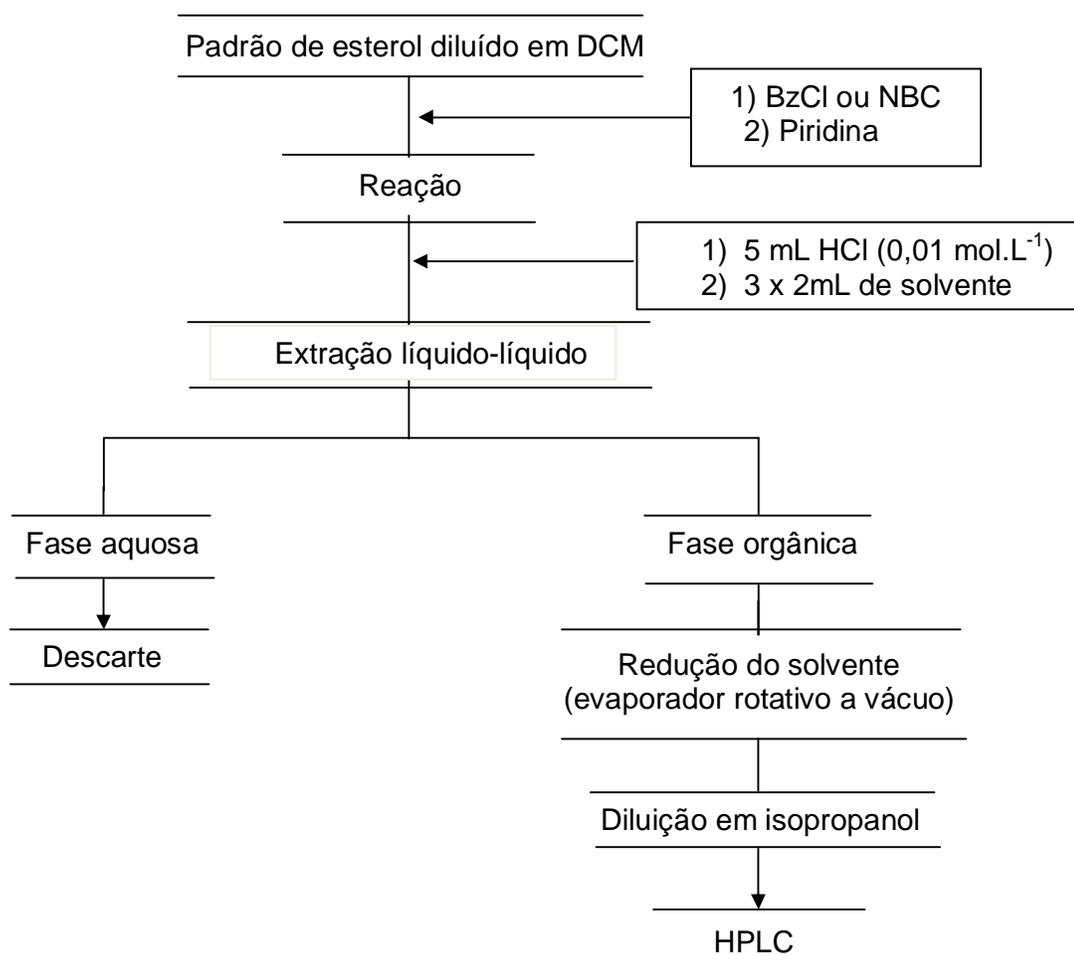


FIGURA 10: Fluxograma do processo de derivatização dos esteróis

Esses testes foram conduzidos em duplicata para cada solvente mencionado, juntamente com o branco. Os resultados foram avaliados em termos de área do

pico referente ao padrão de colesterol, ou seja, quanto maior a área do pico, maior foi a eficiência da extração.

3.10. Otimização da análise por HPLC

A metodologia de análise foi otimizada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC Agilent 1100 Series) com um software (Agilent Chemstation LC Systems), injetor manual com alça de injeção de 20 μ L e detector fotométrico na região do UV-VISÍVEL de múltiplos comprimentos de ondas (MWD).

A identificação dos compostos foi baseada nos respectivos tempos de retenção obtidos para injeção de padrões externos dos esteróis derivatizados com o reagente adequado.

Para os procedimentos descritos a seguir, foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: fator de simetria, fator de separação, resolução dos picos e tempo de análise. Foram avaliados também o perfil do cromatograma e a sensibilidade do método.

A otimização do método de análise por HPLC consistiu de algumas etapas descritas nos itens a seguir.

3.10.1. Fase móvel

Os testes iniciais envolveram a otimização da separação dos 5 esteróis empregando uma fase móvel composta por um ou mais solventes orgânicos e pela água. Para tanto, foram testados diferentes solventes orgânicos (metanol e tetraidrofurano). Em todas as condições de fase móvel testadas, o fluxo também foi avaliado.

Para escolher a condição de análise mais adequada, alguns parâmetros devem ser obtidos, como: fator de simetria entre 0,9 e 1,3 (SNYDER, 1997); resolução dos picos (R) maior que 1,25 (suficiente para quantificação) ou maior que 1,5 (indica separação completa), devendo evitar valores abaixo de 1,0 (COLLINS *et al.*, 2006); maior fator de separação (α) entre os picos possível e menor tempo de análise.

O fator de separação é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção, que são relacionados aos tempos de retenção ajustados de acordo com a Equação 4:

$$\alpha = t_{rb}/t_{ra} \quad (\text{Equação 4})$$

α : fator de separação

t_{ra} e t_{rb} : tempos de retenção dos compostos adjacentes

A resolução entre os pares de compostos foi calculada de acordo com a Equação 5. O fator de separação foi calculado pela razão entre os respectivos tempos de retenção de dois picos adjacentes.

$$R = \frac{(2,35/2) (t_{rb} - t_{ra})}{W_{1/2a} + W_{1/2b}} \quad (\text{Equação 5})$$

t_{ra} e t_{rb} : tempos de retenção dos compostos adjacentes

$W_{1/2a}$ e $W_{1/2b}$: largura do pico à meia altura dos picos adjacentes

3.10.2. Seleção do comprimento de onda (λ) de análise

O aumento da intensidade do sinal melhora a sensibilidade do método e por consequência, melhora os limites de detecção e quantificação do mesmo.

Para tanto, a solução mistura padrão dos 5 esteróis derivatizados foram analisados em diferentes comprimentos de onda compreendidos entre 210 e 250 nm. Assim, o comprimento de onda que proporcionou maior área dos picos dos analitos e menor interferência, foi selecionado no método como comprimento de onda para análise quantitativa.

3.11. Curva analítica

Uma curva analítica foi construída para cada analito. Foram injetadas as soluções padrão da mistura de esteróis benzoilados na faixa de concentração de 20 a 100 mg.L⁻¹.

As soluções padrão mistura (Mix) estoque e as soluções padrão individuais de trabalho foram preparadas de acordo com o esquema da FIGURA 11 e injetadas no HPLC conforme as condições otimizadas para análise.

Uma massa de cada padrão foi derivatizada separadamente com o reagente escolhido cloreto de benzoíla, de acordo com as condições otimizadas para essa etapa. O derivado obtido foi diluído em isopropanol obtendo-se assim a solução padrão estoque de cada um dos derivados dos esteróis, sendo a concentração expressa na forma de esterol. A solução padrão mistura dos 5 esteróis foi obtida a partir da diluição das soluções padrão individuais.

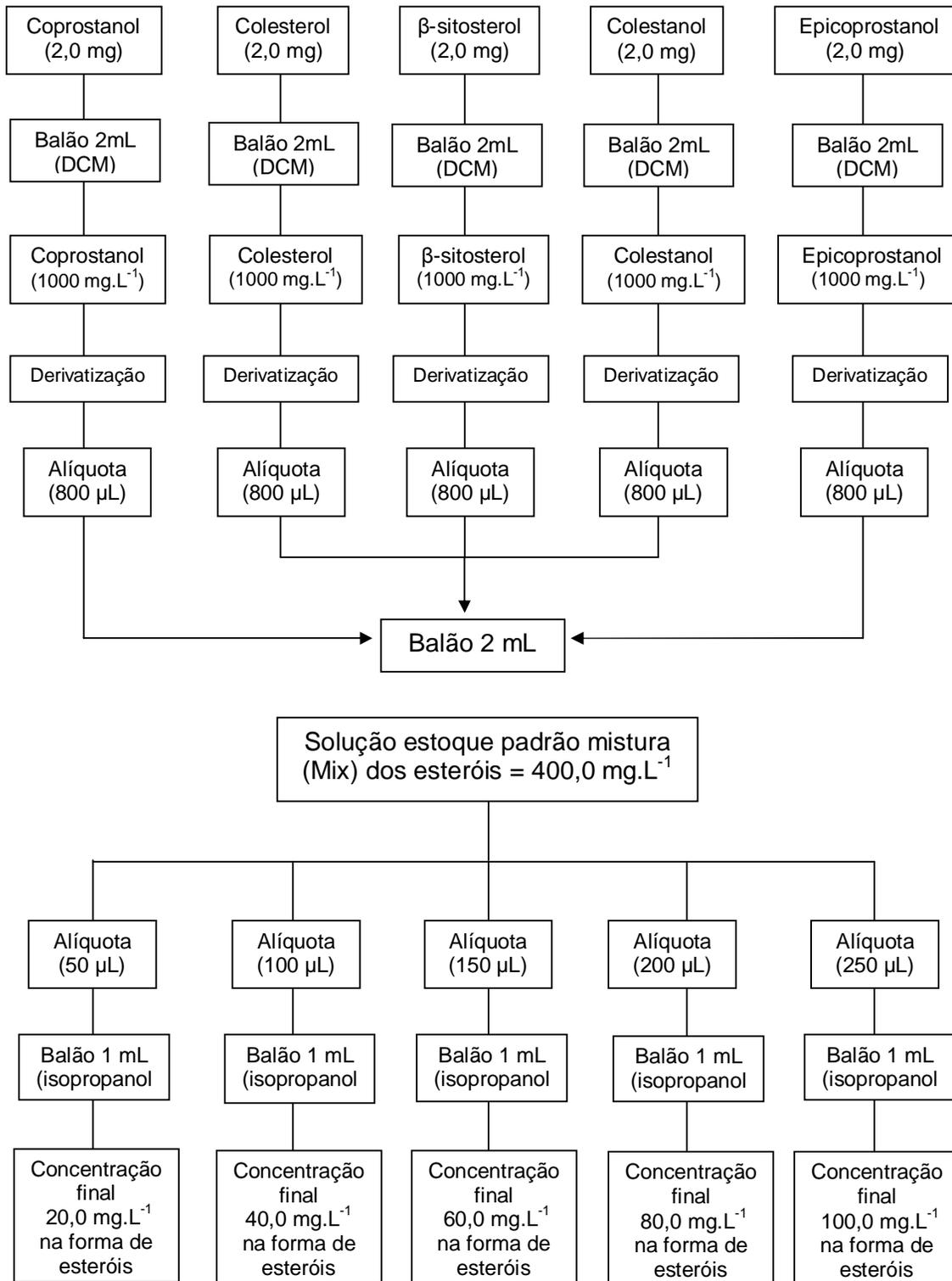


FIGURA 11: Esquema de preparação das soluções padrão mistura (Mix) dos esteróis derivatizados para a curva analítica

3.11.1. Avaliação do método da curva analítica

Para avaliarmos numericamente a qualidade da curva de calibração, que é um modelo linear $y = Ax + B$, onde y é a área dos sinais dos analitos (mUA.s), x é a concentração dos analitos (mg.L^{-1}) e, A e B , são os parâmetros do modelo, foram utilizados os métodos de análise da variância, análise de resíduos e linearidade do método.

3.12. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção do método (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação do método (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004).

O LD e o LQ podem ser estabelecidos de diversas maneiras. Uma das maneiras recomendadas é calcular o LD como 3 vezes o desvio padrão da análise de 5 amostras com baixa concentração dos analitos. O LQ é calculado como 10 vezes o desvio padrão da análise dessas amostras (RIBANI, 2004; SERICANO, 1998).

Para este experimento, recomenda-se a análise de uma amostra limpa ou com baixos níveis de concentração dos analitos. A fortificação é necessária para garantir a quantificação de todos os analitos na amostra.

Para realizar esse procedimento, foram analisadas 5 porções de 10 g da amostra coletada na Represa de São Pedro (amostra controle) foram extraídas após serem fortificadas com 0,06 mg de cada padrão de esterol, obtendo-se 30 mg.L^{-1} como concentração final de cada composto na solução. Após proceder ao tratamento das amostras, essas foram derivatizadas e analisadas por HPLC, conforme as condições otimizadas.

3.13. Controle de qualidade do método

Os procedimentos que avaliaram o controle de qualidade do método foram realizados através dos resultados obtidos na extração de três réplicas do branco (B) e branco adicionado de padrões, denominados de branco fortificados (BF); de três réplicas de uma amostra (M) e da mesma amostra adicionada de padrões, denominadas de amostras fortificadas (MF).

O sulfato de sódio anidro foi utilizado como branco para essas análises. Os brancos e as amostras foram fortificados com a adição de 0,12 mg dos padrões de esteróis a cada uma das réplicas antes do procedimento de extração, obtendo-se a concentração final de 60 mg.L⁻¹ na solução injetada no HPLC. A amostra utilizada nesse procedimento foi coletada na Represa de São Pedro, utilizando 10 g da mesma.

Os critérios adotados foram baseados em SERICANO (1998):

- 1) O branco fortificado deve conter no mínimo 80% dos compostos e apresentar recuperação entre 50 e 120%.
- 2) A amostra fortificada deve conter no mínimo 80% dos analitos com recuperação entre 50 e 120%.
- 3) Desvio padrão relativo (DPR) menor ou igual a 30%.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RIBANI et al., 2004).

A repetitividade do método foi avaliada pela injeção de 5 preparações de uma mesma amostra (coletada na Represa de São Pedro) analisadas em sequência, no mesmo dia. Para isso, 5 porções de 10 g dessa amostra foram extraídas após serem fortificadas com 0,06 mg de cada padrão de esterol, obtendo-se 30 mg.L⁻¹ como concentração final de cada composto na solução injetada no HPLC. Após proceder ao tratamento das amostras, essas foram derivatizadas e injetadas no HPLC, conforme as condições otimizadas.

4. Resultados e discussão dos resultados

4.1. Reação de derivatização

A reação entre esteróis e o reagente cloreto de benzoíla é chamada de reação de benzoilação, que consiste em um método de derivatização em que o grupo benzoíla é adicionado ao grupo hidroxila de compostos como carboidratos, amins biogênicas e esteróis.

Alguns trabalhos descritos na literatura empregam esse tipo de reação para a análise de pequenas concentrações de compostos como carboidratos e esteróis por HPLC com detecção nessa região do espectro, em diferentes matrizes (FRIELER *et al.*, 2009; OZDESTAN e UREN 2009; KWANG-KYOK *et al.*, 2005; ABIDI, 2004).

Essa reação é realizada em meio de piridina, como pode ser observado na FIGURA 12, exemplificando a reação do colesterol com o cloreto de benzoíla.

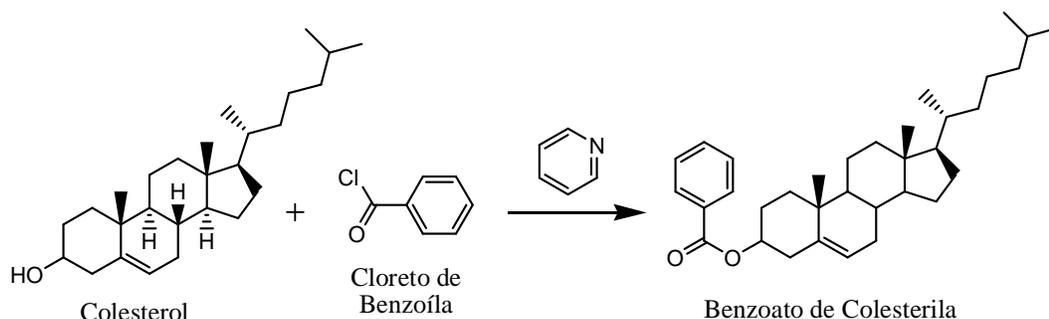


FIGURA 12: Esquema da reação de derivatização entre colesterol e cloreto de benzoíla

O outro reagente testado foi o cloreto de p-nitrobenzoíla e a reação entre esse e os esteróis é chamada de reação de nitrobenzoilação. Esse procedimento é similar a benzoilação, e consiste em um método de reação em que o grupo nitrobenzoíla é adicionado ao grupo hidroxila de compostos como carboidratos e esteróis (MAO *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2002; KIYOSHIMA, *et al.*, 2001; NOJIRI, *et al.*, 2000; TACHE, *et al.*, 2000). Essa reação também é realizada em meio de piridina. Segundo FITZPATRICK e SIGGIA (1973), a incorporação do grupo nitro nos compostos derivatizados resulta em um aumento na intensidade do sinal analisado, aumentando a sensibilidade do método.

Essa reação pode ser observada na FIGURA 13, que mostra como o colesterol reage com o cloreto de p-nitrobenzoíla.

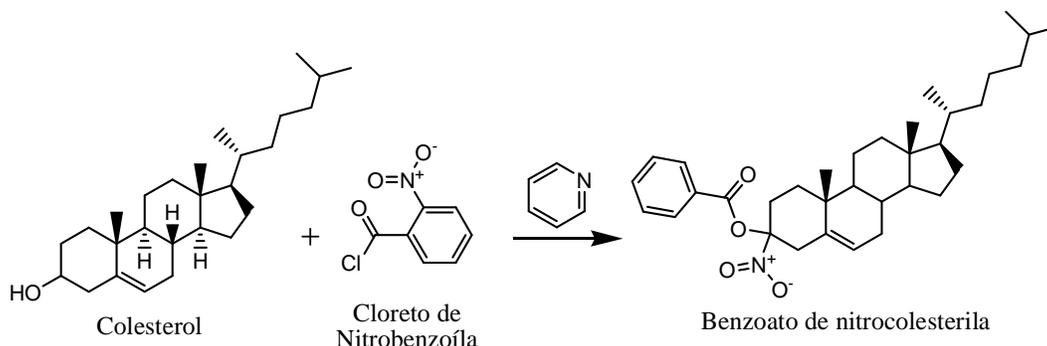


FIGURA 13: Esquema da reação de derivatização entre colesterol e cloreto de benzoíla

Para todos os esteróis em questão, as reações para ambos os derivatizantes seguem o mesmo procedimento esquematizado nas FIGURAS 12 e 13.

4.1.1. Processo de reação de derivatização

O primeiro estudo do processo de reação de derivatização foi realizado no decorrer da otimização das condições de análise do método proposto por HPLC. As condições de fase móvel utilizadas nas análises dos testes realizados com os derivados do cloreto de benzoíla e cloreto de p-nitrobenzoíla foram diferentes, uma vez que os esteróis nitrobenzoilados são ligeiramente mais polares que os benzoilados.

Os cromatogramas relativos às reações mencionadas obtidos nas melhores condições de análise dos esteróis epicoprostanol (Epi), colesterol (Col) e colestanol (Col), estão ilustrados nas FIGURAS 14A e 14B na mesma escala para sinal.

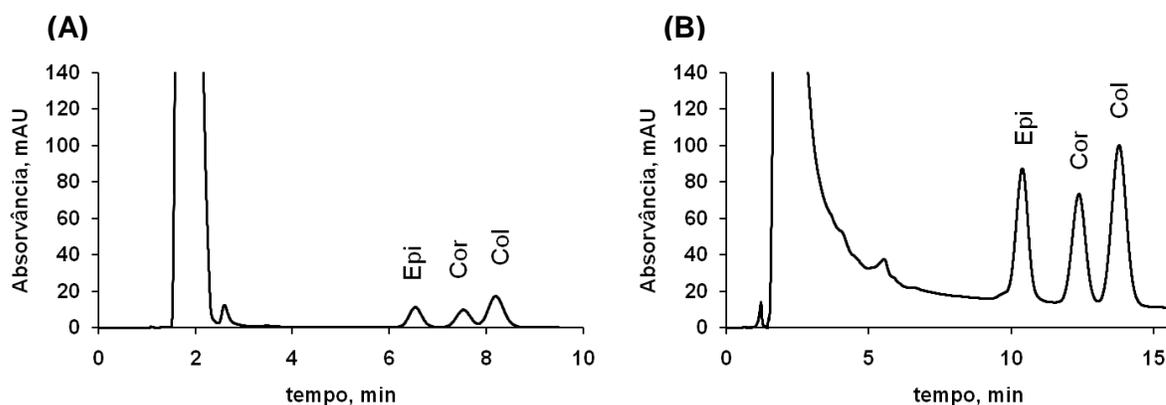


FIGURA 14: Cromatogramas obtidos para eluição na coluna RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μ m); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μ m): **(A)** esteróis nitrobenzoilados, fase móvel MeOH/Isopropanol/H₂O (50:45:5), fluxo de 1mL/min, λ = 254 nm; **(B)** esteróis benzoilados fase móvel MeOH, fluxo 1mL.min⁻¹, detecção em 230 nm.

Nas condições estudadas, a análise dos esteróis, na forma de derivados benzoilados, mostrou-se mais sensível. Conforme foi abordado no item 4.1, os resultados obtidos nestes experimentos discordam de alguns trabalhos reportados na literatura, os quais relatam que, de uma maneira geral sob as mesmas condições de análise, os sinais de esteróis nitrobenzoilados são mais intensos que os benzoilados. Sendo assim, outras condições foram testadas para realizar a reação de nitrobenzilação com os esteróis estudados.

O segundo experimento foi realizado visando aumentar o rendimento da reação de nitrobenzilação, variando a temperatura da reação. Uma vez que, segundo NOJIRI (2000), a temperatura influencia na eficiência desse tipo de reação.

Os cromatogramas relativos às reações mencionadas obtidos nas melhores condições de análise estão ilustrados nas FIGURAS 15A e 15B na mesma escala para sinal.

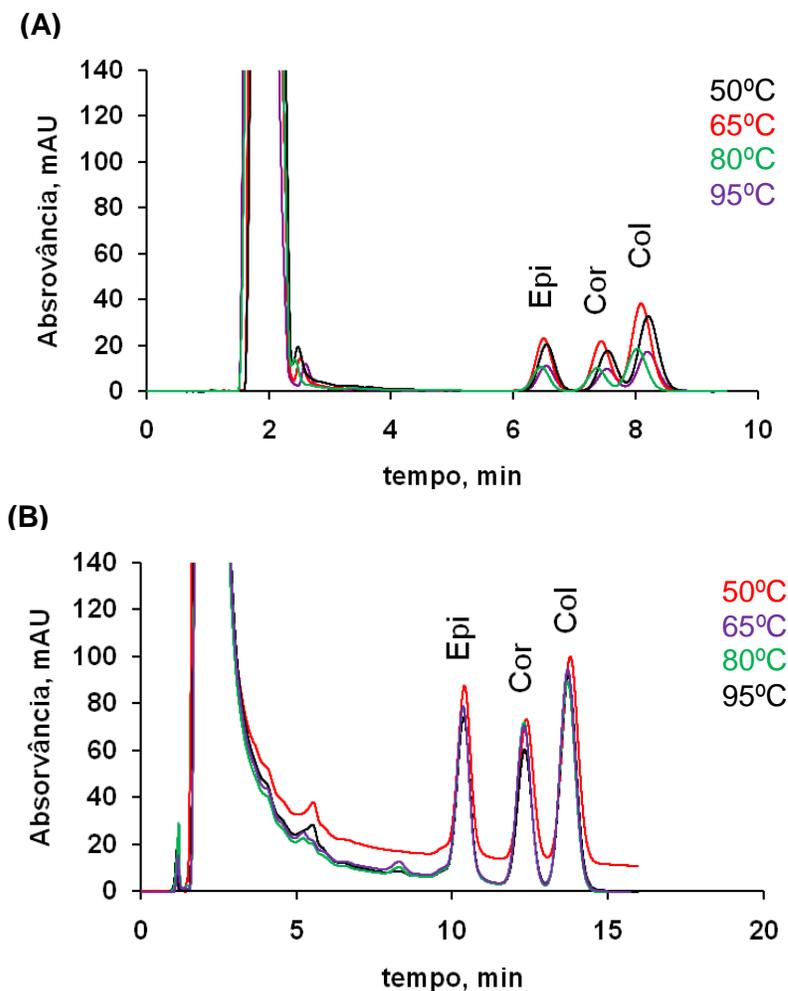


FIGURA 15: Cromatogramas obtidos para eluição na coluna RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μ m); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μ m): **(A)** esteróis nitrobenzoilados em diferentes temperaturas, fase móvel MeOH/Isopropanol/H₂O (50:45:5), fluxo 1 mL.min⁻¹, detecção em 254 nm; **(B)** esteróis benzoilados em diferentes temperaturas, fase móvel MeOH, fluxo de 1 mL.min⁻¹, detecção em 230 nm

Na FIGURA 15A, pode-se observar que até 65°C houve um aumento em termos de intensidade de sinal de todos os esteróis derivatizados com NBC. Para temperaturas acima dessa, houve um decréscimo dos sinais dos analitos, sugerindo que houve degradação dos analitos.

Na FIGURA 15B, pode-se observar que não houve diferenças significativas no sinal ao variar a temperatura.

Ao comparar as FIGURAS 15A e 15B, conclui-se que mesmo variando a temperatura, os valores de área dos picos dos esteróis benzoilados continuaram sendo maiores que para os nitrobenzoilados.

Uma hipótese para esse resultado é que provavelmente a reação de nitrobenzoilação para os esteróis estudados neste trabalho não foi eficiente, ou seja, o rendimento desse tipo de reação foi baixo, especificamente, para esses analitos.

Portanto, optou-se por continuar os estudos de otimização com o reagente derivatizante cloreto de benzoíla (BzCl), que são os resultados do terceiro estudo da reação de derivatização dos esteróis estudados.

De acordo com ABIDI (2004), a reação de derivatização entre esteróis e cloreto de benzoíla é realizada em temperatura ambiente, em repouso por 12 horas. Para diminuir o tempo de reação sem prejudicar o rendimento da mesma, foi realizado um estudo empregando o ultrassom, uma vez que, o mesmo pode conduzir a um aumento da eficiência da reação em um menor tempo.

Na TABELA 3 estão reportados os valores médios das áreas (n=2) obtidas para os compostos estudados analisados por HPLC sob as mesmas condições.

TABELA 3: Valores médios de áreas dos picos dos compostos (n=2) derivatizados nas condições de reação realizadas em ultrassom e em repouso, em temperatura ambiente

Tempo de reação	Epicoprostanol		Colesterol		Coletanol	
	Área média (mAU.s)	DPR (%)	Área média (mAU.s)	DPR (%)	Área média (mAU.s)	DPR (%)
30 min no US	1961,5	0,1	2043,6	0,6	2485,2	1,2
45 min no US	2025,9	2,2	2029,6	3,9	2559,1	3,3
60 min no US	1956,1	1,5	1950,9	2,1	2479,8	1,7
75 min no US	1889,3	3,3	1861,9	1,6	2390,9	2,4
12 horas em repouso	1990,9	0,1	1451,1	15,9	2388,2	5,4

Na derivatização em ultrassom, pôde-se observar que até 45 minutos houve um aumento na eficiência da reação para os compostos epicoprostanol e coletanol. Já para o colesterol, o rendimento permaneceu constante. A partir de 45 minutos de reação, observou-se um declínio de rendimento para todos os compostos, sugerindo, desse modo, que após esse tempo de reação houve degradação dos compostos. Sendo assim, o maior rendimento de reação foi obtido em 45 minutos de ultrassom.

Para os experimentos realizados em repouso, foi observado que o rendimento da reação foi similar ao obtido por ultrassom em 45 minutos para todos os compostos estudados, como é mostrado na TABELA 3.

Concluiu-se, ao comparar os valores de área para os compostos estudados, que a reação de derivatização pode ser realizada em ultrassom com um tempo bem menor, sem ocorrer a diminuição da eficiência da mesma.

Os valores de desvio padrão relativo (DPR) para o processo de derivatização realizado em ultrassom por 45 minutos ficaram entre 2,2 e 3,9%, enquanto que para o processo realizado em repouso por 12 horas variaram entre 0,1 e 15,9%.

Então, a melhor condição de reação testada e adotada para a realização dos experimentos de avaliação do método com a mistura padrão dos 5 esteróis foi utilizando o reagente cloreto de benzoíla realizada em ultrassom por um tempo de 45 minutos de reação.

4.1.2. Solvente utilizado na extração líquido-líquido

O excesso de cloreto de benzoíla e de piridina é solubilizado na fase aquosa e o meio ácido favorece a solubilização da piridina. Neste trabalho, foram utilizadas, então, a partição solvente orgânico e solução de ácido clorídrico (HCl) 0,01 mol.L⁻¹.

Como já foi mencionado anteriormente, os compostos estudados apresentam estrutura química e propriedades semelhantes. De uma maneira geral, eles apresentaram a mesma tendência ou comportamento nos estudos realizados. Portanto, o experimento para escolha do solvente de extração para a reação de derivatização foi realizado apenas com o colesterol, sendo o resultado extrapolado para os demais compostos.

Os resultados para os valores médios (n=2) de área do colesterol para os testes de extração realizados com diferentes solventes orgânicos estão dispostos na TABELA 4.

TABELA 4: Média dos valores das áreas (n=2) dos picos obtidos nos cromatogramas para derivatização do colesterol com BzCl empregando diferentes solventes para extração dos derivados com os valores de DPR

Solvente testado	Média das áreas (n=2) (mAU.s)	DPR (%)
Diclorometano	466,1	14 %
n-hexano	499,5	4 %
Acetato de etila	500,1	15%

DPR = desvio padrão relativo

Os valores de área do pico referente ao colesterol para todos os solventes utilizados nessa etapa foram similares. Entretanto, os valores obtidos para os desvios-padrão relativos percentual foram 15% para acetato de etila, 14% para DCM e 4% para n-hexano, que estão abaixo do valor limite de 30%.

Por isso, o solvente mais adequado para a extração líquido-líquido da etapa de derivatização foi o n-hexano por apresentar menor valor para desvio padrão relativo (DPR), ou seja, maior precisão. Além disso, para a realização da partição em tubos de ensaio (com tampa de rosca), a manipulação com diclorometano foi mais difícil, visto que o mesmo é mais denso que a água. Neste caso, o procedimento para recolher a fase orgânica, que é a fase desejada, se tornou mais difícil, podendo ocasionar erros durante a execução do procedimento.

Nenhum dos compostos estudados foi detectado na análise dos brancos dos solventes.

As condições de reação de derivatização pré-coluna estabelecidas para análise dos 5 esteróis por HPLC estão esquematizadas na FIGURA 16.

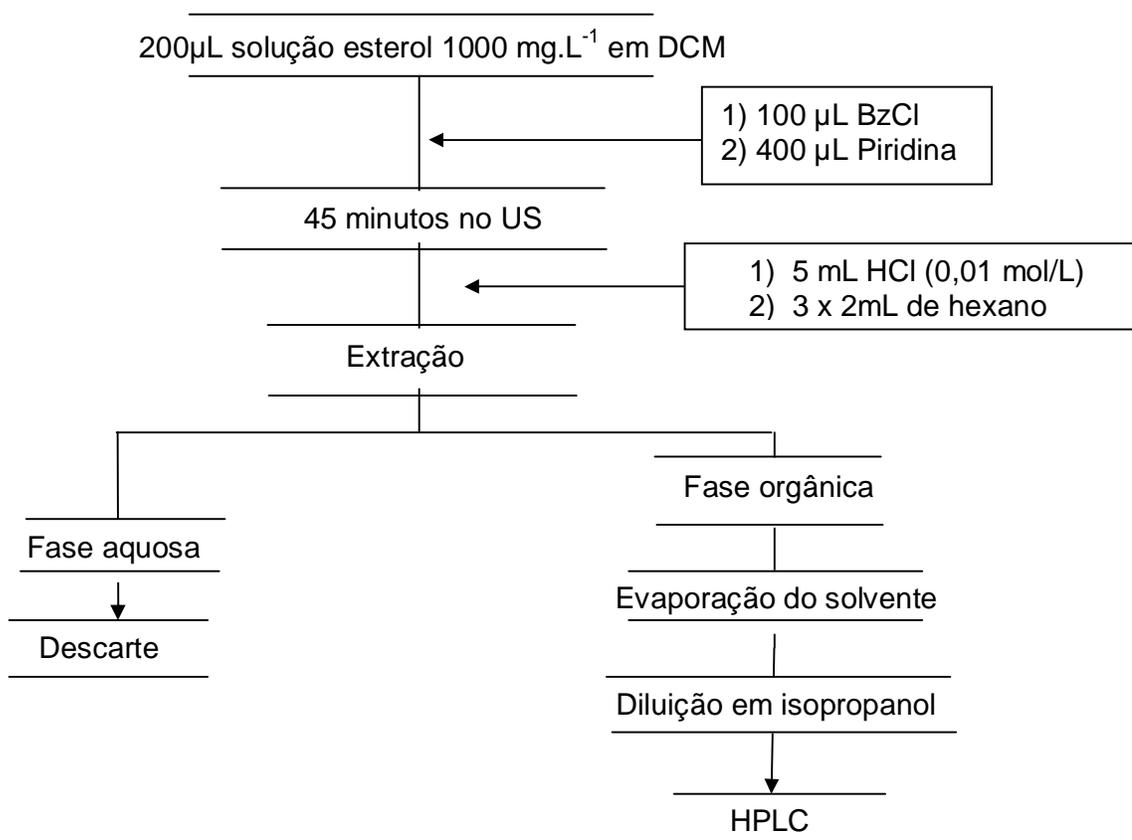


FIGURA 16: Representação do esquema otimizado para reação de derivatização dos padrões de esteróis para análise por HPLC com detecção no UV

4.2. Otimização da separação por HPLC

4.2.1. Seleção da coluna cromatográfica

De acordo com SNYDER (1997), para análise de amostras neutras como os esteróis, a coluna cromatográfica de fase reversa é a primeira escolha para o início da otimização de um método, uma vez que essa é tipicamente mais conveniente e robusta, além de gerar resultados mais satisfatórios na separação final.

Apesar da coluna de fase reversa ser mais adequada para separação de compostos hidrofílicos e os esteróis serem hidrofóbicos, resultados satisfatórios podem ser obtidos para esses compostos, visto que esse tipo de coluna é mais eficiente, estável e reprodutível que a coluna de fase normal.

A coluna de fase normal nem sempre é a melhor opção. Esse tipo de coluna apresenta algumas desvantagens. Em alguns casos, o número de pratos teóricos observado nesse tipo de coluna é menor do que em colunas de fase reversa, o controle da variação dos solventes pode ser menos previsível e mais tedioso, o tempo de retenção dos compostos normalmente varia durante sucessivas análises, além do maior consumo de solvente orgânico, o que resulta em um maior custo de análise.

Devido aos fatores citados acima, optou-se por utilizar uma coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (4,6 mm x 150,0 mm, 5 µm) com coluna de guarda ZORBAX ODS (4,6 mm x 12,5 mm, 5 µm). Na literatura também são encontrados resultados satisfatórios na análise de esteróis em diferentes matrizes após sua derivatização utilizando esse tipo de colunas de fase reversa (ZARZYCKI et al., 2006; ABIDI et. al., 2004).

4.2.2. Otimização da fase móvel

Os estudos para otimização de fase móvel foram baseados em SNYDER (1997) e no trabalho de ABIDI (2004).

Para compostos como os esteróis, melhores resultados de separação e resolução dos picos são obtidos, em fase reversa, utilizando como fase móvel a água juntamente com solventes orgânicos mais apolares, como metanol ou tetraidrofurano. Utilizando acetonitrila (ACN), que é um solvente mais polar que os demais, poderão ser obtidos resultados insatisfatórios, como aumento do tempo de análise e pouca resolução de bandas (SNYDER, 1997).

No início do desenvolvimento do método por HPLC, os gradientes exploratórios foram realizados para estimar a percentagem do solvente orgânico ideal para realizar uma eluição isocrática ou mesmo otimizar as condições para análise por gradiente (SNYDER, 2007). O gradiente exploratório consiste em um cromatograma com uma variação linear da proporção do solvente orgânico, partindo de 0 até atingir 100% em 60 minutos de análise.

Para iniciar a otimização da fase móvel na coluna C18, foram realizados dois gradientes exploratórios. O primeiro foi realizado utilizando os solventes H₂O e metanol e o segundo, utilizando H₂O e THF.

A FIGURA 17 ilustra o cromatograma obtido para o gradiente exploratório realizado com H₂O e THF para a injeção da mistura padrão dos 5 esteróis derivatizados com cloreto de benzoíla. A variação da porcentagem de THF na fase móvel no decorrer da análise também está ilustrada na FIGURA 17.

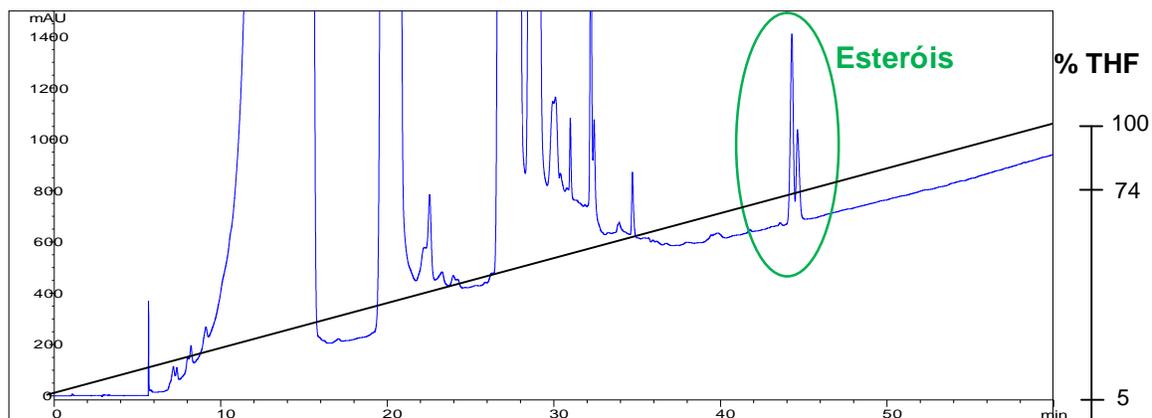


FIGURA 17: Cromatograma do gradiente exploratório entre H₂O e THF, para a injeção da solução mistura padrão dos 5 esteróis derivatizados (100 mg.L⁻¹ na forma de esterol), coluna de fase reversa C18, fluxo 1 mL.min⁻¹, detecção em 230 nm

Através dos resultados obtidos pelo gradiente exploratório da FIGURA 17, foi verificado que os esteróis eluíram por volta de 74 % de solvente THF e 36 % de H₂O.

Para o gradiente exploratório realizado com H₂O e metanol, os picos dos esteróis eluíram com 100 % de metanol sem apresentar separação eficiente dos 5 esteróis benzoilados, como pode ser visto na FIGURA 18.

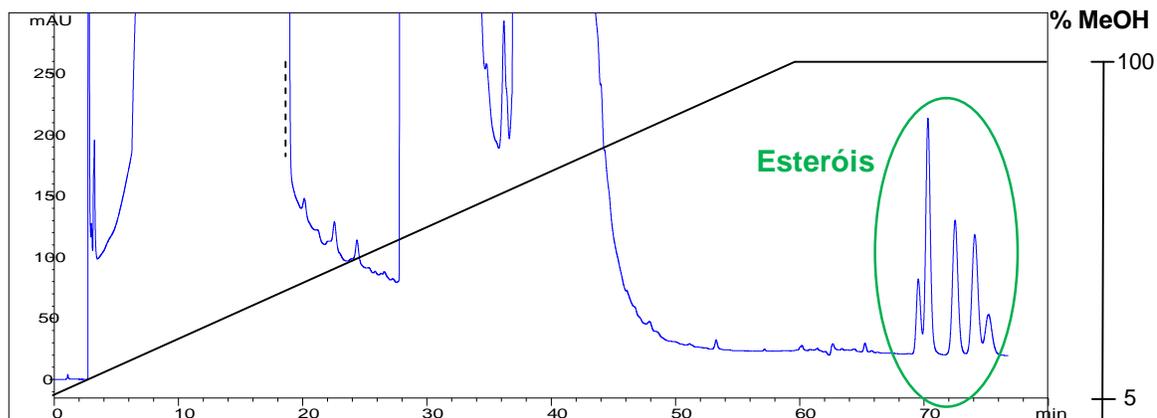


FIGURA 18: Cromatograma do gradiente exploratório entre H₂O e metanol, para a injeção da solução mistura padrão dos 5 esteróis derivatizados (100 mg.L⁻¹ na forma de esterol), coluna de fase reversa C18, fluxo de 1 mL.min⁻¹, detecção em 230 nm

Os picos que eluem anteriormente aos picos dos esteróis nos cromatogramas das FIGURAS 17 e 18 são os picos dos reagentes utilizados no processo de derivatização.

Uma condição para eluição isocrática foi estimada pelo gradiente exploratório H₂O/THF a uma proporção de 36:74 v/v, respectivamente. No entanto, a análise da mistura de padrão de esteróis nesta condição apresentou coeluição dos analitos. Para separar esses compostos, foi preciso diminuir a proporção de THF e aumentar a de H₂O, ou seja, aumentar a polaridade da fase móvel.

Com este propósito, algumas condições de fase móvel composta por diferentes proporções de água e THF foram testadas, porém os resultados não foram satisfatórios. O tempo de análise aumentou consideravelmente, com valores superiores a 45 minutos, sendo que a separação ainda foi ineficiente, havendo coeluição dos compostos.

Desta maneira, optou-se por utilizar a fase móvel composta pela mistura ternária composta por água e os solventes orgânicos metanol e THF, mantendo uma alta proporção de metanol.

No gradiente exploratório da FIGURA 18, entre água e metanol, os esteróis só eluíram quando foi atingido 100% de metanol, porém sem apresentar separação eficiente.

Iniciou-se a otimização da fase móvel ternária com a seguinte proporção: metanol/THF/H₂O (70:25:5) (ABIDI, 2004). Com essa proporção dos solventes, houve coeluição dos compostos, não havendo separação satisfatória. Então, a partir dessa condição, foram realizados alguns testes variando-se aleatoriamente a composição da fase móvel a fim de chegar a uma condição que apresentasse boa separação para os compostos estudados.

Com estes resultados, pôde-se verificar que para separar esses compostos, era necessário manter uma alta proporção de metanol. Quando aumentava a proporção de THF, o tempo de corrida diminuía, mas a separação não era eficiente. Ao aumentar a proporção de H₂O, a separação melhorava, mas o tempo de análise aumentava muito. Então, para otimizar a fase móvel, foi preciso encontrar proporções de THF, H₂O e metanol que produzissem boa separação dos analitos em um menor tempo de análise.

Para chegar a uma condição de fase móvel satisfatória, variou-se a composição dos solventes de acordo com a TABELA 5. Doze condições foram testadas e as proporções foram inicialmente testadas com essa fase móvel ternária.

TABELA 5: Composição de fase móvel ternária testados

Condição	Metanol (%)	THF (%)	H₂O (%)	Fluxo (mL.min⁻¹)
1	90	5	5	1,0
2	85	10	5	1,0
3	75	20	5	1,0
4	83	10	7	1,5
5	81	12	7	1,5
6	79	12	9	1,5
7	77	14	9	1,5
8	75	14	11	1,5
9	81	10	9	1,5
10	81	10	9	2,0
11	83	9	8	1,5
12	83	9	8	1,7

As condições de fluxo da fase móvel também foram variadas de acordo com o tempo de análise de cada condição estudada. Se o tempo de análise aumentava consideravelmente, aumentava-se o fluxo. Assim, pode-se encontrar uma condição que apresentasse boa separação, de acordo com os parâmetros cromatográficos desejados, em um menor tempo de análise.

Na TABELA 6 encontram-se os valores de fator de separação (α) e tempo de análise para cada composição de fase móvel estudada, com exceção da condição de número 3. Essa condição não foi avaliada porque houve coeluição dos picos dos compostos coprostanol e epicoprostanol e dos compostos colesterol e sitosterol.

TABELA 6: Valores de fator de separação (α) e do tempo de análise para cada composição de fase móvel estudada obtidas para a mistura padrão dos esteróis benzoilados (100 mg.L^{-1} na forma de esteroil) analisada por HPLC com detecção em 230 nm

Condição	Fluxo (mL.min^{-1})	α_1	α_2	α_3	α_4	Tempo de Análise (min)
1	1,0	1,090	1,179	1,139	1,098	34,0
2	1,0	1,084	1,136	1,133	1,072	22,0
4	1,5	1,103	1,120	1,148	1,094	21,3
5	1,5	1,100	1,098	1,143	1,086	18,0
6	1,5	1,112	1,103	1,155	1,102	28,5
7	1,5	1,105	1,086	1,151	1,099	23,5
8	1,5	1,117	1,091	1,160	1,117	37,5
9	1,5	1,114	1,116	1,155	1,118	34,0
10	2,0	1,116	1,114	1,160	1,117	26,5
11	1,5	1,102	1,144	1,152	1,109	31,0
12	1,7	1,107	1,131	1,150	1,107	26,0

As condições foram avaliadas, primeiramente, em termos desses dois parâmetros cromatográficos, (α) e tempo de análise, porque eles avaliam os principais objetivos desse estudo: separação e tempo. Se a condição de fase móvel definida por esses parâmetros também apresentasse valores aceitáveis para resolução e simetria dos picos, essa seria então a condição adequada para a análise.

Pela TABELA 6, concluiu-se que a condição de número 12 mostrou melhores valores de separação juntamente com um tempo de análise satisfatório, em comparação com as demais condições. A condição de número 10 apesar de ter apresentado valores de fator de separação maiores que a condição 12 da TABELA 5, foi realizada em uma taxa de fluxo maior (2 mL.min^{-1}). Fluxos altos aumentam a pressão do sistema podendo, ao longo do tempo, deteriorar a coluna cromatográfica, diminuindo o seu tempo de vida.

Os parâmetros cromatográficos obtidos para os 5 esteróis benzoilados, de acordo com sua ordem de eluição, estão apresentados na TABELA 7.

TABELA 7: Parâmetros de separação obtidos para a mistura padrão dos esteróis benzoilados (100 mg.L^{-1} na forma de esterol) eluída no HPLC com metanol/água/tetraidrofurano (83:8:9 v/v), fluxo de $1,7 \text{ mL.min}^{-1}$, detecção em 230 nm

Analito	Tempo de retenção (min)	Fator de Separação (α)	Resolução	Simetria
Coprostanol	14,386	-	-	1,04
Epicoprostanol	15,907	1,106	1,32	0,98
Colesterol	18,105	1,138	1,72	0,97
Colestanol	20,891	1,154	1,92	0,96
β -sitosterol	23,124	1,107	1,35	0,90

Os valores para resolução dos picos dos esteróis nessa condição variaram de 1,31 a 1,93; que são considerados satisfatórios para separação e quantificação dos analitos. Os valores de simetria dos mesmos variaram entre 0,960 e 1,040 e também se encontram dentro da faixa aceitável dos critérios adotados descritos no item 3.10.1.

4.2.3. Comprimento de onda da análise

Para os esteróis benzoilados, o comprimento de onda (λ) de máxima absorção reportado na literatura é de 230 nm. O detector de múltiplos comprimentos de onda permite a análise simultânea em cinco comprimentos de onda distintos. Sendo assim, foram selecionados para o estudo os valores entre 210 e 250 nm, com variação de 10 em 10 nm. O estudo foi realizado injetando-se uma solução mistura padrão dos cinco esteróis derivatizados com cloreto de benzoíla (BzCl). Como podemos observar na FIGURA 19 A, foram obtidos sinais mais intensos em 230 nm.

A partir destes resultados uma faixa de comprimentos de onda mais estreita foi analisada, com variação de 4 em 4 nm, sendo os valores de λ de 224 a 238 nm (FIGURA 19 B). Novamente, o comprimento de onda de maior intensidade dos sinais dos analitos foi 230 nm.

De acordo com os resultados obtidos, optou-se por utilizar o comprimento de onda de 230 nm na análise dos esteróis coprostanol (Cop), epicoprostanol (Epi), colesterol (Cor), colestanol (Col) e sitosterol (Sit) benzoilados.

Nas FIGURAS 19A e 19B estão apresentados os sinais dos esteróis derivatizados com cloreto de benzoila nos três comprimentos de onda que apresentaram os maiores valores de absorvância.

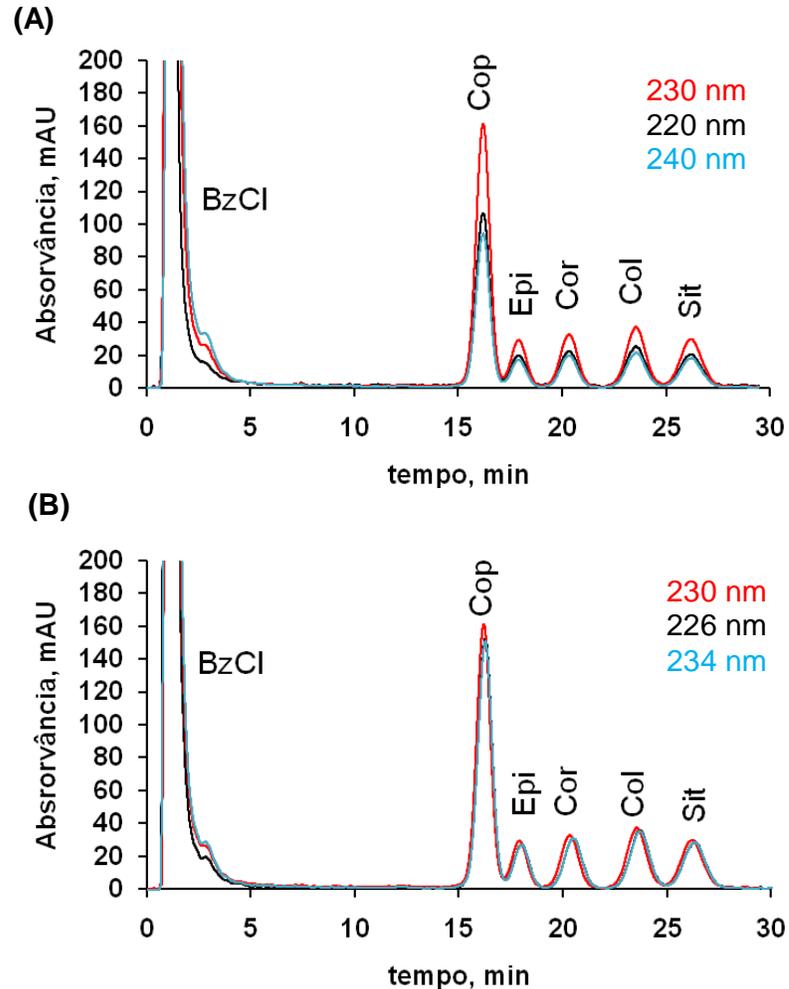


FIGURA 19: Cromatograma obtido para eluição da solução padrão mistura dos derivados benzoilados dos esteróis (concentrações do coprostanol igual a 200 mg.L^{-1} e dos demais esteróis igual a $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na forma de esterol), em coluna de fase reversa C18, fluxo de $1,7 \text{ mL.min}^{-1}$, tempo total de análise de 26 minutos, em diferentes comprimentos de onda: **(A)** de 220 a 240 nm e **(B)** de 226 a 234 nm.

4.2.4. Condição de análise otimizada por HPLC

As condições finais empregadas para análise dos esteróis por HPLC foram:

- 1) Coluna: Fase reversa, octadecilsilano, C-18
- 2) Fase móvel: metanol/THF/H₂O (83:9:8)
- 3) Fluxo: 1,7 mL.min⁻¹
- 4) Comprimento de onda: 230 nm
- 5) Tempo total de análise: 26 minutos

A FIGURA 20 apresenta o cromatograma obtido para análise da mistura padrão dos derivados benzoilados dos esteróis coprostanol (Cop), sitosterol (Sit), colestanol (Col), colesterol (Cor) e epicoprostanol (Epi), na condição de número 12 da TABELA 5 otimizada de fase móvel.

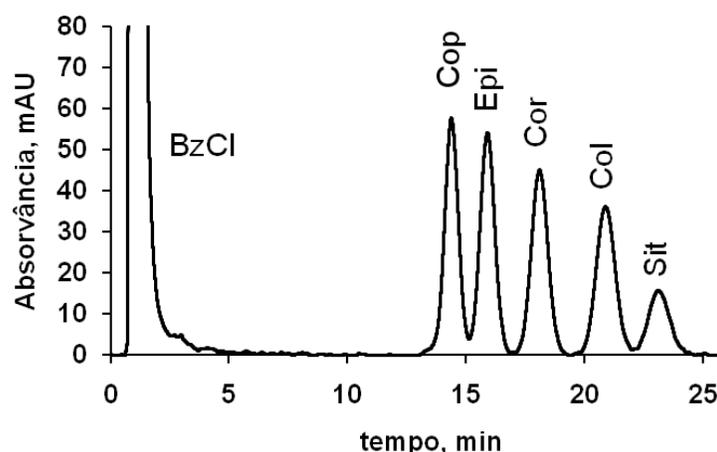


Figura 20: Cromatograma obtido para eluição da solução padrão mistura dos 5 derivados benzoilados dos esteróis (100 mg.L⁻¹ na forma de esterol), detecção em 230 nm em coluna de fase reversa C18, fluxo de 1,7 mL.min⁻¹, tempo total de análise de 26 minutos

4.3. Curvas Analíticas

A FIGURA 21 apresenta as curvas analíticas para os 5 esteróis resolvidos. Os padrões foram derivatizados e analisados por HPLC conforme as condições otimizadas nos itens 4.1 e 4.2.4, respectivamente.

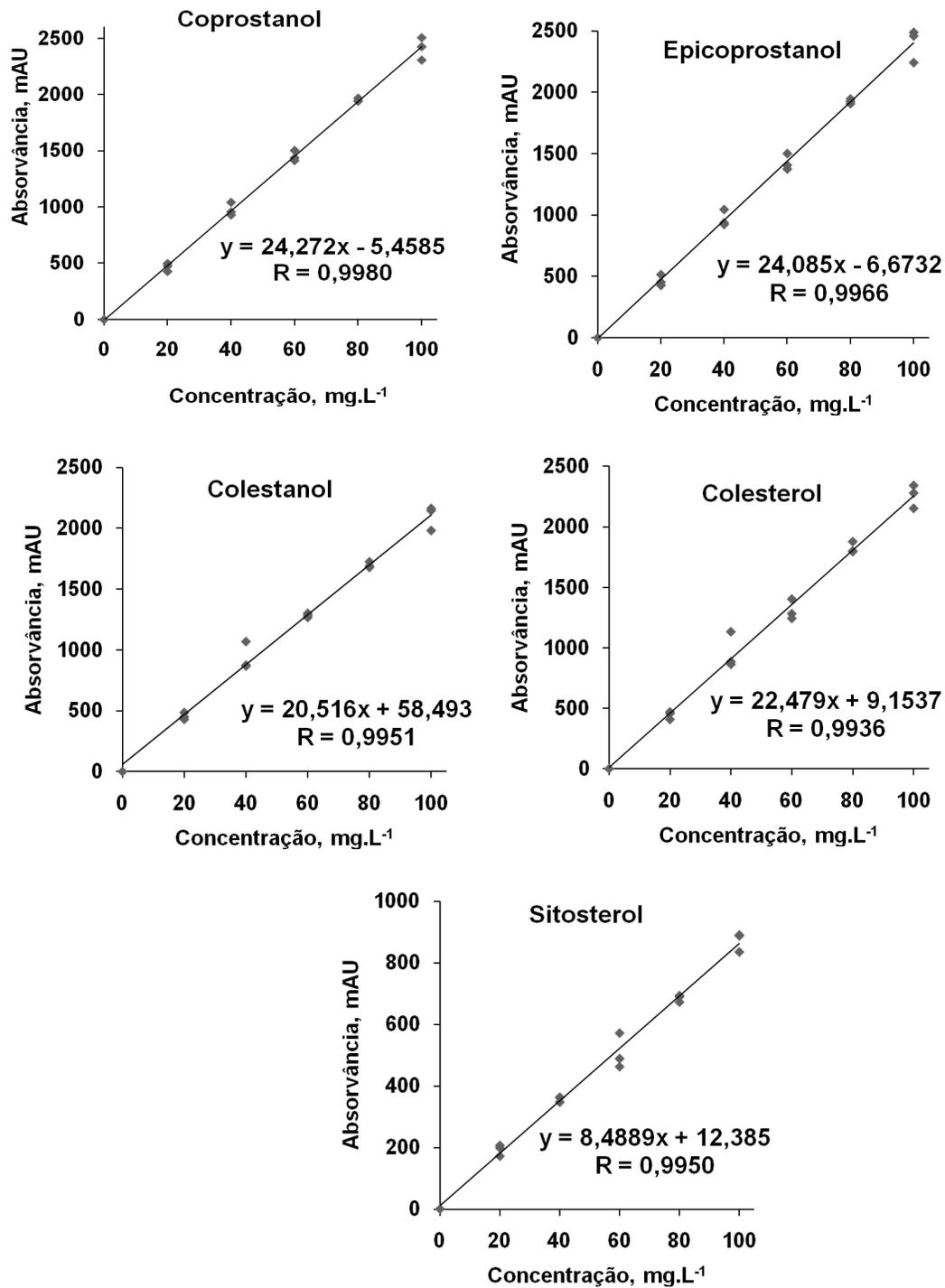


Figura 21: Curvas analíticas preparadas em triplicata dos esteróis bezoilados nas concentrações 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 mg.L⁻¹ (expressas na forma de esterol)

4.3.1. Análise da variância

Segundo NETO *et al.*, (2007) a análise da variância é o melhor método para exame dos resíduos, que é de fundamental importância para avaliar a qualidade do ajuste de qualquer modelo.

Para aplicar o método de análise da variância, os procedimentos experimentais foram realizados com repetições autênticas e de forma aleatória (PIMENTEL E NETO, 1995).

Os elementos para Análise de Variância estão reunidos na TABELA 8.

TABELA 8: Tabela de análise da variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados

Fonte	Soma Quadrática	G.L.	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p-1	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p-1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r / (n-p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m-p	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	n-m	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n-m)$
Total	$SQ_t = \sum \sum (y_{ij} - y_m)^2$	n-1	

n_i = número de repetições no nível i ($n_i=3$), m = número de níveis distintos da variável x ($m = 6$), $n = \sum n_i$ = número total de medidas ($n = 18$), p = número de parâmetros do modelo ($p = 2$). O índice i indica o nível da variável x ; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x . O segundo somatório das expressões para SQ_{reg} , SQ_{ep} e SQ_r vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. y_m é a média de todos os valores de y , y_{im} é a média das determinações repetidas no nível i . O termo SQ significa soma quadrática e MQ significa média quadrática.

Se o modelo está bem ajustado, a média quadrática devida a falta de ajuste (MQ_{faj}) reflete apenas aos erros aleatórios. Como a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{ep}) também é uma estimativa dos erros aleatórios, nesse caso tanto MQ_{faj} quanto MQ_{ep} estariam estimando a mesma grandeza, a variância populacional. Então, espera-se que seus valores numéricos não sejam diferentes. Portanto, a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} é comparada com o ponto de distribuição F correspondente aos

mesmos números de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido. Ou seja, a razão MQ_{raj}/MQ_{ep} deve ser menor que o valor de $F_{v_{raj}, v_{ep}}$ tabelado, em um determinado nível de confiança.

Ao avaliar as curvas analíticas acima pela Análise da Variância, pôde-se concluir que não houve falta de ajuste no modelo, ou seja, o modelo apresentou linearidade satisfatória. Uma vez que os valores de F calculados para as curvas analíticas apresentadas na FIGURA 21 foram menores que o valor de $F_{4,11}$ tabelado a um nível de 95 % de confiança. Os resultados são mostrados na TABELA 9.

TABELA 9: Valores de F calculado e tabelado para análise da variância para cada analito a um nível de 95% de confiança

Analitos	Valor de F calculado	Valor de $F_{4,11}$ tabelado
Coprostanol	0,17	3,36
Epicoprostanol	0,07	3,36
Colestanol	0,75	3,36
Colesterol	0,67	3,36
Sitosterol	0,50	3,36

4.3.2. Análise de resíduos

Além da análise da variância, é importante examinar os resíduos deixados pelo modelo. Esses devem dar a impressão de terem sido produzidos por uma distribuição normal e aleatória, indicando que sua variância é constante (PIMENTEL e NETO, 1995).

Os gráficos dos resíduos são exibidos na FIGURA 22. Como a curva analítica foi preparada em triplicata, no gráfico encontram-se os valores de resíduos obtidos para as três soluções injetadas em cada nível de concentração.

Através da análise de resíduos realizada para cada curva analítica dos esteróis, pôde-se concluir que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente e de forma não tendenciosa, como pode ser verificado nos gráficos da FIGURA 22.

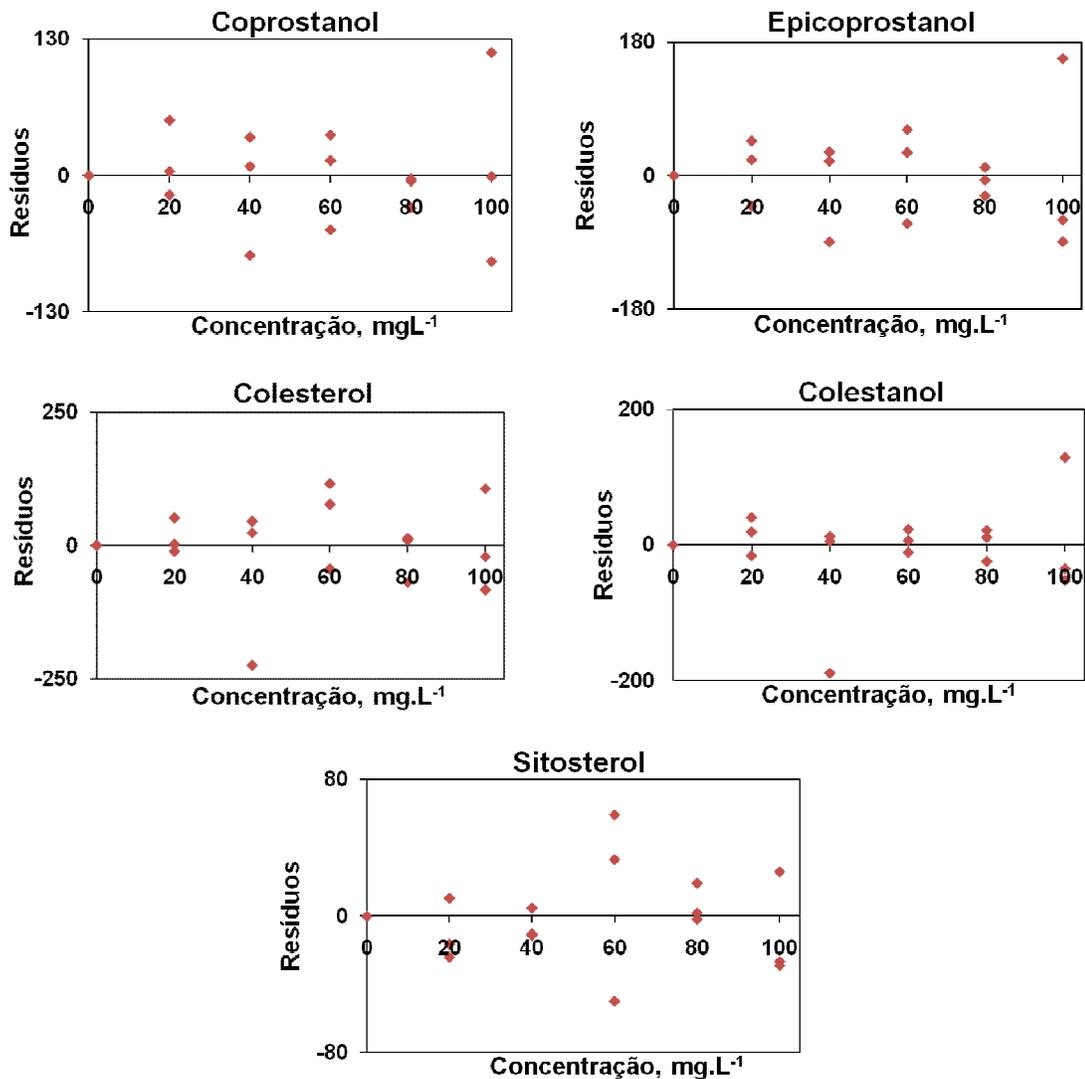


Figura 22: Gráficos de análise de resíduos para as curvas analíticas dos esteróis estudados

4.3.3. Linearidade do método

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. O coeficiente de correlação é uma medida do grau de relação linear entre o sinal medido (área dos picos) e a concentração da espécie a ser quantificada (RIBANI et al., 2004).

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal do dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação acima de 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI et al., 2004; SERICANO, 1998).

Os valores de coeficiente de correlação das curvas analíticas dos esteróis da FIGURA 21 variaram entre 0,9935 e 0,9980. Portanto, esses valores representaram mais uma evidência de que as curvas analíticas dos esteróis mostraram-se lineares na faixa de concentração estudada, 20,0 a 100,0 mg.L⁻¹.

4.4. Limite de detecção e quantificação do método e repetitividade

Os valores dos limites de detecção do método (LD) e de quantificação do método (LQ) calculados para a matriz estão dispostos na TABELA 10 expressos em mg.L⁻¹ e na TABELA 11, em µg.g⁻¹.

Os resultados referentes à repetitividade se mostraram satisfatórios, com valores de desvio padrão relativo entre 2,87 e 9,50%, sendo todos menores que o valor máximo aceitável que é 30%. Devem ser consideradas as etapas de tratamento e as transferências ocorridas durante o procedimento analítico.

TABELA 10: Limites de detecção e quantificação do método (expressos em mg.L⁻¹) e repetitividade obtidos para uma massa da amostra Represa de São Pedro de 10,0 gramas (n =5)

Analito	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)	Desvio Padrão
Coprostanol	2,18	7,28	0,73
Epicoprostanol	4,17	13,90	1,39
Colesterol	3,25	10,82	1,08
Colestanol	3,14	10,48	1,05
Sitosterol	1,90	6,32	0,63

LQ = limite de quantificação

LD = limite de detecção

TABELA 11: Limites de detecção e quantificação do método (expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$) e repetitividade obtidos para uma massa da amostra Represa de São Pedro de 10,0 gramas ($n = 5$)

Analito	LD ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Coprostanol	0,001	0,0032	0,0003
Epicoprostanol	0,019	0,063	0,006
Colesterol	0,015	0,049	0,005
Colestanol	0,014	0,047	0,005
Sitosterol	0,009	0,028	0,003

LQ = limite de quantificação

LD = limite de detecção

4.5. Teste para eluição dos compostos para a purificação dos extratos

O procedimento adotado para esse teste está descrito no item 3.6.1.1. Após analisar a primeira fração recolhida (12 mL), os percentuais de recuperação dos esteróis utilizando a mistura de solventes metanol e diclorometano 1:1, variaram entre 89 e 98 %. As três frações restantes de 2 mL não apresentaram nenhum dos compostos estudados e nenhum dos compostos também foi detectado na amostra em branco eluída na coluna.

Concluiu-se, então, que o volume de 12 mL da mistura de solventes utilizada como eluente para purificação dos extratos das amostras de sedimentos foi suficiente para eluir os compostos estudados no procedimento de purificação dos extratos no tratamento 1 das amostras.

4.6. Estudo da recuperação das amostras fortificadas

Os dois procedimentos de tratamento de amostra propostos foram realizados conforme o item 3.6. O tratamento 1 foi esquematizada na FIGURA 8 e o 2, na FIGURA 9, na página 23. Os resultados para ambos os testes realizados em duplicata para as amostras fortificadas encontram-se nas TABELAS 12 e 13.

TABELA 12: Percentuais de recuperação médios e desvios padrões relativos obtidos para tratamento 2 das amostras fortificadas com 80,0 mg.L⁻¹ de cada padrão de esterol (sem realizar a etapa de purificação dos extratos)

Analito	Concentração ± Sd (mg.L ⁻¹)	Recuperação ± Sd (%)	DPR (%)
Epicoprostanol	58,3 ± 4,6	72,9 ± 5,7	7,8
Colesterol	62,1 ± 3,1	77,7 ± 3,8	4,9
Colestanol	72,2 ± 3,0	90,3 ± 3,7	4,1

Sd: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

TABELA 13: Percentuais de recuperação médios e desvios padrões relativos obtidos para tratamento 1 das amostras fortificadas com 80 mg.L⁻¹ de cada padrão de esterol (realizando a etapa de purificação dos extratos)

Analito	Concentração ± Sd (mg.L ⁻¹)	Recuperação ± Sd (%)	DPR (%)
Epicoprostanol	59,1 ± 3,4	73,9 ± 4,3	5,8
Colesterol	61,3 ± 3,4	76,6 ± 4,3	5,6
Colestanol	71,5 ± 4,1	89,3 ± 5,1	5,7

Sd: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

Os percentuais de recuperação para o procedimento de tratamento 2 variaram entre 72,9 e 90,3% e para o procedimento de tratamento 1, variaram entre 73,9 e 89,3%.

Pôde-se concluir que ambos os processos de tratamento de amostra estudados apresentaram valores de desvio padrão relativo satisfatórios, com índices abaixo de 30%, que representa o valor máximo aceitável para esse tipo de análise.

Ao comparar os resultados obtidos para amostras fortificadas pelo teste *t* para os dois procedimentos, concluiu-se que não houve diferenças significativas em relação ao percentual de recuperação dos analitos adicionados para os dois métodos, a um nível de 95% de confiança para todos os compostos.

Com isso, optou-se por realizar o procedimento de tratamento 2, que não realiza a etapa de purificação dos extratos. Neste caso, houve a diminuição do número de etapas de transferência e concentração das amostras, minimizando, assim, a possibilidade de inserção de compostos estranhos não desejáveis ou, até

mesmo, perda de massa das amostras, que pode ser mais crítico quando se trabalha com padronização externa.

4.7. Resultado da avaliação do controle de qualidade do método

Os resultados obtidos nesse teste realizado para as análises dos brancos fortificados e das amostras fortificadas descritos no item 3.13 são apresentados na TABELA 14.

TABELA 13: Percentuais médios de recuperação e desvios padrões relativos alcançados para amostra e branco fortificados com mistura padrão dos esteróis ($60,0 \text{ mg.L}^{-1}$)

Analito	Branco fortificado (n=3)			Amostra fortificada (n=3)		
	Concentração (mg.L^{-1})	Recuperação (%)	DPR (%)	Concentração (mg.L^{-1})	Recuperação (%)	DPR (%)
Coprostanol	42,3	70,4	9,0	38,8	64,7	2,1
Epicoprostanol	48,4	80,7	5,9	41,5	69,1	5,1
Colesterol	52,7	87,9	4,7	39,9	66,6	3,7
Colestanol	60,4	100,6	5,6	53,4	89,1	8,1
β -sitosterol	40,1	66,9	1,5	44,5	74,1	14,0

Foram realizadas também as análises dessa mesma amostra e do branco sem fortificação, em triplicata, e nessas análises não foram detectados os sinais dos analitos.

Os percentuais de recuperação do branco fortificado variaram de 66,9 a 100,6 % e das amostras fortificadas, de 64,7 a 89,1 %. Todos esses valores estão em conformidade com os critérios de controle de qualidade do método. Os valores de desvio padrão relativo variaram entre 1,5 e a 14% e encontram-se em conformidade com os critérios de controle de qualidade do método.

4.8. Metodologia otimizada para determinação de esteróis por HPLC em amostras reais de sedimentos

A extração das amostras consistiu da seguinte maneira: 30 g de sedimento seco foram pesados em frascos de vidro e adicionados 20 mL da mistura de solventes diclorometano e metanol (1:1). Os frascos foram fechados e levados o ultrassom por 30 minutos. Após esse tempo, os extratos foram recolhidos com o auxílio de uma pipeta Pasteur para balões de fundo chato. A extração foi realizada em três etapas de sonicação com combinação dos extratos, sendo que a segunda e a terceira extrações foram feitas adicionando 10 mL da mistura de solventes utilizada na primeira extração, com um total de 40 mL de extrato por amostra.

Não houve a necessidade de centrifugar os extratos, uma vez que as amostras coletadas apresentaram aparentemente granulometria mais grossa, de característica arenosa.

Em seguida, os extratos foram filtrados em um pré-filtro de fibra de vidro, com porosidade de 1 μm e 25 mm de diâmetro, e logo depois, concentrados em um evaporador rotativo a vácuo com um banho termostatizado a 55°C para redução de volume até 10,0 mL. Deste volume, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL e transferidas para recipientes de alumínio para determinação da matéria orgânica extraída. A outra porção do extrato (9,0 mL) foi concentrada para realizar o processo de derivatização das amostras.

Os extratos foram transferidos para tubos de ensaio com rosca, onde adicionaram-se 100 μL de cloreto de benzoíla e 400 μL de piridina para proceder à reação de derivatização, que foi realizada em ultrassom por 45 minutos. Após cessado esse tempo, para realizar a extração dos derivados benzoilados foram adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 2 mL do solvente orgânico n-hexano.

A fase orgânica foi recolhida e a extração foi realizada mais duas vezes, adicionando 2 mL de n-hexano em cada extração. Novamente, os extratos foram combinados e recolhidos para concentrá-los em um evaporador rotativo a vácuo e corrente de argônio. O resíduo obtido foi dissolvido em isopropanol obtendo-se o volume final de 300 μL . As amostras foram, então, analisadas por HPLC.

Com essa metodologia proposta, buscou-se maior rapidez no procedimento de tratamento das amostras sem perder a eficiência e a minimização dos possíveis interferentes na análise dos esteróis. A FIGURA 23 apresenta o fluxograma da metodologia proposta para análise dos esteróis por HPLC.

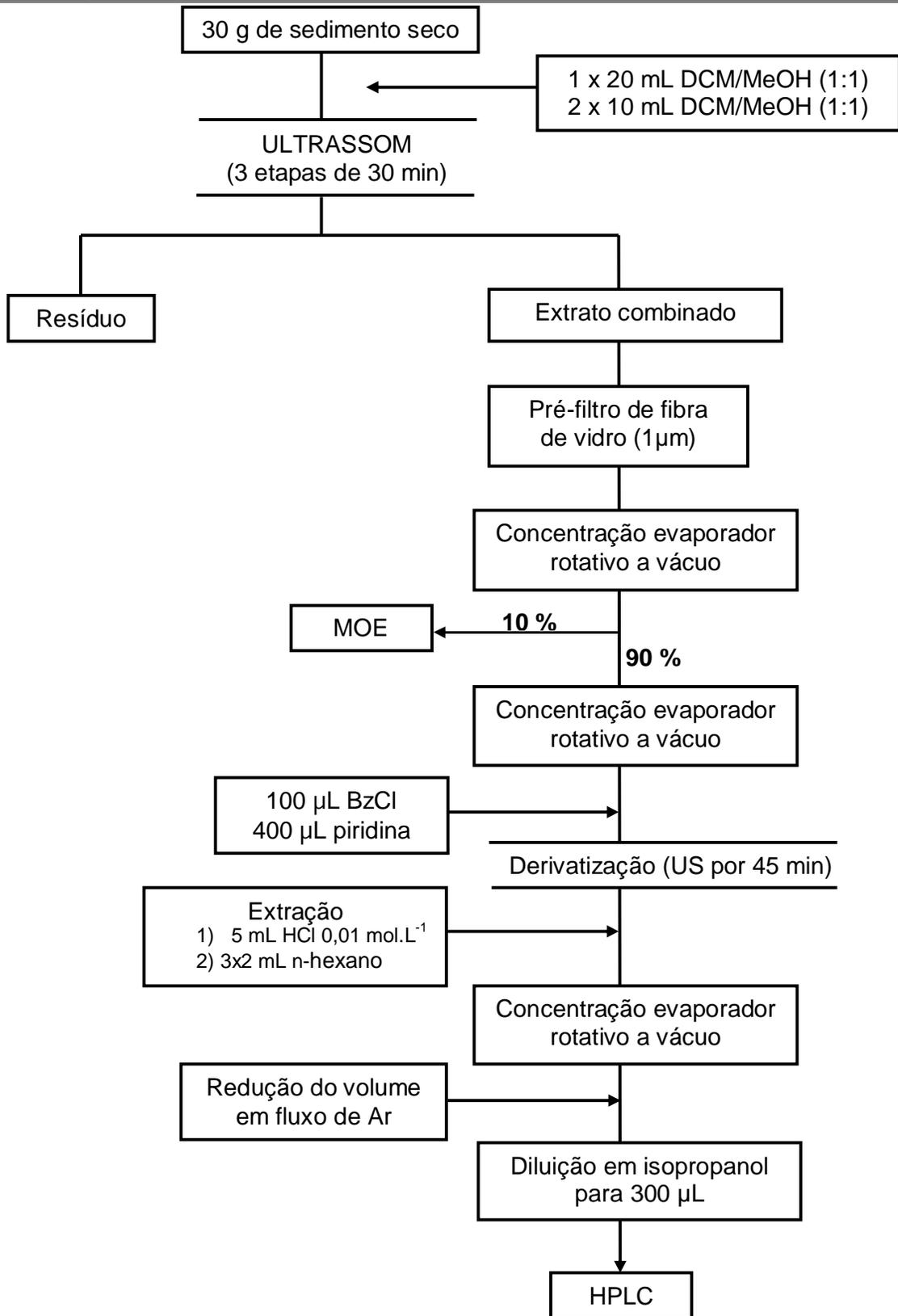


Figura 23: Fluxograma da metodologia analítica utilizada para determinação de esteróis fecais em amostras reais de sedimento por HPLC

5. Análise das amostras de sedimentos

A metodologia otimizada no item 4.8 para amostras reais foi aplicada para as análises das amostras de sedimentos coletadas em 6 córregos da cidade de Juiz de Fora, afluentes do Rio Paraibuna, que foram selecionados para o estudo. Os resultados dessas análises estão apresentados na TABELA 15.

Os cromatogramas obtidos para análise das amostras dos córregos Campo Grande (ponto 1) e Humaitá (ponto 2), juntamente com o cromatograma da solução padrão mistura dos esteróis benzoilados são mostrados FIGURA 24.

Os sedimentos das amostras coletadas apresentaram, aparentemente, grânulos maiores, de característica arenosa. Como mencionado anteriormente, os sedimentos constituídos por partículas de maior tamanho demonstram uma reduzida capacidade de adsorção de compostos orgânicos, como os esteróis. Porém, apesar das amostras apresentarem essa característica, foi possível realizar as análises desses compostos nos sedimentos coletados.

A amostra córrego Matirumbide (ponto 4), foi a amostra que apresentou maior concentração do coprostanol, principal esterol de origem fecal. O valor de concentração desse esterol obtido nesse ponto ficou bem acima da média encontrada para as outras amostras. A amostra que apresentou menor concentração de coprostanol foi a amostra do córrego Fazenda Floresta.

TABELA 14: Concentrações ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco) de esteróis nas amostras de sedimento de córregos da cidade de Juiz de Fora, coletadas em julho e outubro de 2010.

Amostras	Coprostanol		Epicoprostanol		Colesterol		Coestanol		Sitosterol	
	$\mu\text{g.g}^{-1}$	DPR (%)	$\mu\text{g.g}^{-1}$	DPR (%)	$\mu\text{g.g}^{-1}$	DPR (%)	$\mu\text{g.g}^{-1}$	DPR (%)	$\mu\text{g.g}^{-1}$	DPR (%)
1) Campo Grande	2,08	2,18	0,19	20,86	1,01	7,65	0,11	0,56	0,23	5,92
2) Humaitá	0,62	1,27	0,12	5,18	0,45	6,99	0,27	20,98	0,17	29,60
3) Carlos Chagas	3,46	1,41	0,31	0,06	2,07	19,68	0,17	29,30	0,17	16,11
4) Tapera	3,41	13,47	0,31	19,64	1,89	6,73	0,08	5,84	0,44	21,50
5) Matirumbide	14,48	0,07	1,40	23,57	4,11	7,90	0,67	27,09	0,77	6,87
6) Floresta	$5,00 \times 10^{-3}$	7,57	< LQ	–	0,07	19,73	< LQ	–	0,45	22,13
7) Represa de São Pedro (amostra controle)	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–

ND = Não Detectado

LQ = Limite de Quantificação

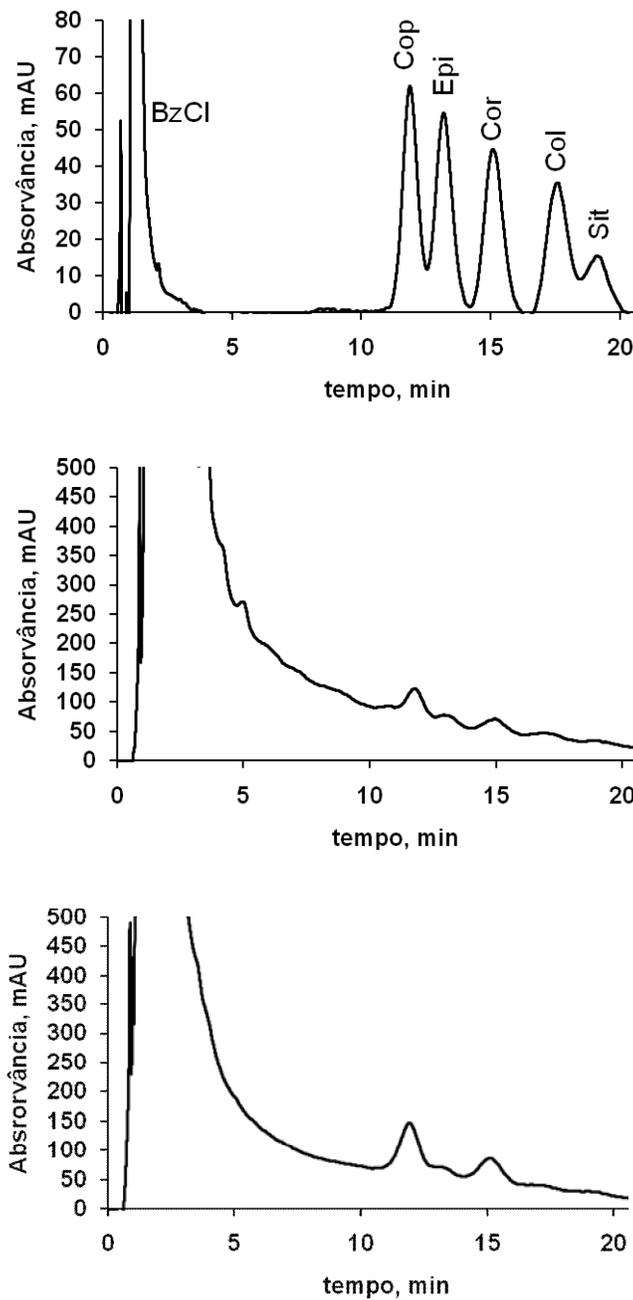


Figura 24: Cromatogramas em diferentes escalas: **(A)** solução padrão mistura dos 5 esteróis benzoilados 100 mg.L^{-1} , **(B)** amostra córrego Humaitá (ponto 3) e **(C)** amostra Campo Grande (ponto 1). Coluna Zorbax ODS (4,6 mm x 150,0 mm, 5 μm), coluna de guarda ZORBAX ODS (4,6 mm x 12,5 mm, 5 μm), coluna de guarda ZORBAX ODS (4,6 mm x 12,5 mm, 5 μm), fase móvel: metanol/THF/ H_2O (83:9:8), fluxo $1,7 \text{ mL.min}^{-1}$, detecção em 230 nm.

Os critérios e parâmetros de avaliação da contaminação por esgoto, descritos na TABELA 1, foram aplicados para as amostras coletadas para caracterização

desses ambientes e os resultados dessa avaliação estão apresentados na TABELA 16.

TABELA 15: Resultado da avaliação realizada pelos critérios e parâmetros de que avaliam a contaminação fecal nas amostras analisadas

Pontos de Coleta	Critérios e parâmetros de avaliação					Conclusão
	Critério 1 ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Critério 2	Critério 3	Critério 4	Critério 5	
1	2,08 > 0,50	3,53 > 1,00	0,10 < 0,20	0,96 > 0,70	1,15	Contaminado
2	0,62 > 0,50	1,38 > 1,00	0,20 = 0,20	0,70 = 0,70	2,65	Contaminado
3	3,46 > 0,50	1,67 > 1,00	0,09 < 0,20	0,95 > 0,70	1,22	Contaminado
4	3,41 > 0,50	1,80 > 1,00	0,09 < 0,20	0,98 > 0,70	4,25	Contaminado
5	14,48 > 0,50	2,06 > 1,00	0,10 < 0,20	0,96 > 0,70	5,30	Contaminado
6	0,005 < 0,50	0,75 < 1,00	0,15 < 0,20	–	0,18	Não contaminado

Critério 1: Concentração de coprostanol

Critério 2: Coprostanol/colesterol

Critério 3: Epicoprostanol/coprostanol

Critério 4: Coprostanol/(coprostanol+colestanol)

Critério 5: Colesterol/sitosterol

A concentração de coprostanol nas amostras pontos de 1 a 5 foram maiores que $0,50 \mu\text{g.g}^{-1}$ (critério 1), indicando que todas estão contaminadas por poluição de origem fecal. Somente a amostra do córrego Fazenda Floresta (ponto 6) apresentou concentração de coprostanol abaixo desse valor estabelecido como critério. Porém, a utilização desse critério não deve ser considerada como parâmetro conclusivo. Por esse motivo, a possível introdução fecal nesses ambientes foi avaliada também por outros parâmetros.

A razão coprostanol/colesterol (critério 2), pode indicar se a área é afetada por esgotos ou não. Esse parâmetro foi calculado e a única amostra que apresentou índice abaixo de 1,00 foi a amostra coletada no córrego Fazenda Floresta (ponto 6), caracterizando, assim, ausência de contaminação fecal.

A relação epicoprostanol/coprostanol (critério 3) permite estimar o grau de tratamento de efluente descartado em uma área. Todas as amostras mostraram

receber esgoto sem tratamento de descontaminação. Realmente, todos esses córregos recebem esgotos “in natura” nos seus corpos d’água.

Outra ferramenta importante da origem da contaminação fecal é a coprostanol/(coprostanol+colestanol) (critério 4). O coprostanol é mais associado ao trato intestinal de mamíferos superiores, enquanto que o colestanol é associado a fontes naturais. Os resultados obtidos através desse índice mostraram que todas as amostras apresentaram valores acima de 0,70, portanto, contaminadas. Para a amostra ponto 6 não foi possível utilizar esse critério, já que nessa amostra não foi detectado o sinal de colestanol.

O esterol β -sitosterol está associado a plantas vasculares terrestres. A razão colesterol/ β -sitosterol (critério 5) próximo de zero, caracteriza o ambiente como não contaminado por fezes. A única amostra que apresentou esse índice foi a amostra do córrego Fazenda Floresta (ponto 6). Esse foi mais um critério de avaliação que indicou ausência de contaminação fecal nesse local de coleta.

Os resultados obtidos pelos parâmetros de avaliação de contaminação fecal estão de acordo com a realidade dos córregos da cidade de Juiz de Fora. Concluiu-se que a amostra ponto 6 foi a única das amostras analisadas caracterizada como não contaminada por fezes. Como mencionado anteriormente, essa se localiza em uma região afastada da cidade, sendo assim mais preservada que os demais pontos de coleta.

As demais amostras foram caracterizadas como contaminadas por fezes, o que na realidade é verdade. Esses córregos recebem esgoto sem nenhum tratamento prévio para descontaminação, possuem mau cheiro e os sedimentos se apresentam de cor bem escura.

A amostra córrego Matirumbide (ponto 4) apresentou maior concentração de coprostanol e maior índice de contaminação fecal. Esse local foi o que apresentou visualmente mais características de ambientes poluídos: lixo, sedimentos de cor bem escura e mau cheiro.

Esses córregos se situam perto de domicílios, alguns deles no quintal de diversas residências. O contato direto com esses córregos é prejudicial ao homem e outras espécies de animais, uma vez que esses ambientes podem ser transmissores de doenças.

5.1. Percentual de matéria orgânica extraída (% MOE)

Os resultados obtidos para determinação da matéria orgânica extraída (MOE) para as amostras de sedimento estão apresentadas na FIGURA 25. Os valores médios de MOE (% m/m) variaram de 0,0033 a 0,12 %.

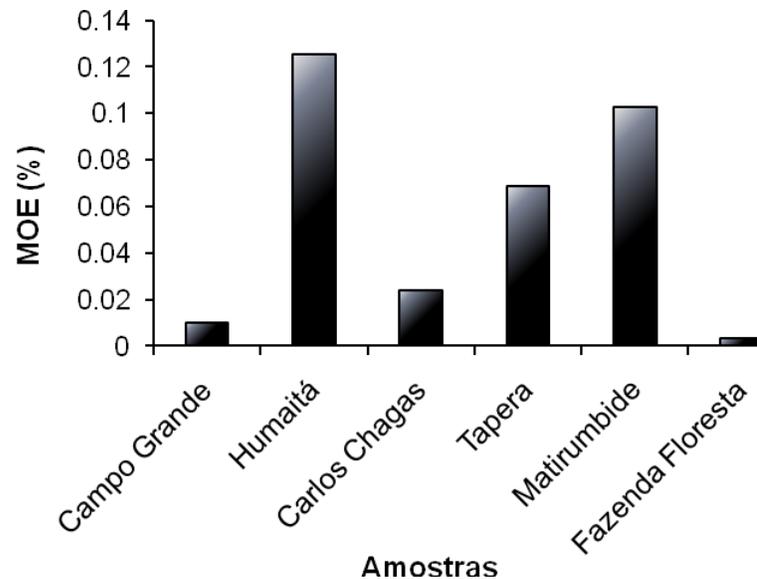


Figura 25: Percentual de matéria orgânica extraída das amostras de sedimento

Os valores de teor de matéria orgânica extraída foram correlacionados com os resultados de concentração dos esteróis nas seis amostras de sedimento analisadas. Os resultados obtidos indicaram que, em um nível de 95% de confiança, não houve correlação linear entre o teor de matéria orgânica extraída e concentração dos esteróis nas amostras.

6. Comparação com outros estudos

A TABELA 17 compara os resultados obtidos nesse trabalho para os níveis de concentração de coprostanol, que é o principal esterol de origem fecal, obtidos nas amostras analisadas com outros trabalhos realizados em diferentes regiões do mundo referentes a amostras de sedimentos lacustres.

TABELA 16: Comparação dos níveis de concentração de coprostanol obtidos em amostras de sedimentos lacustres de diferentes áreas de estudo

Área estudada	Concentração de Coprostanol ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Fonte
Córregos de Juiz de Fora	0,0050 a 14,48	Presente trabalho, 2011
Rio Mississipi, EUA	0,05 a 1,60	BARBER e WRITER, 1998
Rio Han, Coréia do Norte	0,00034 a 3,8	LI et al., 2007
Rio Barigui, Brasil	0,25 a 196	MARTINS, R. F., 2008
Lagoa dos Patos, Brasil	0,00014 a 0,0918	MARTINS et al., 2007
Rio Capibaribe	0,52 a 7,32	FERNANDES et al., 1999
Rio Formosa, Portugal	0,10 a 41,80	MUDGE e BEBIANNO, 1997
Rios da Malásia	0,037 a 15,5	ISOBE et al., 2002

Todos esses autores utilizaram a técnica de Cromatografia a Gás para quantificar o coprostanol em amostras de sedimentos. Somente os níveis de concentração de coprostanol foram utilizados como parâmetros de comparação, uma vez que nem todos esses trabalhos analisaram os mesmos esteróis analisados nesse trabalho.

Então, pela TABELA 17 pôde-se concluir que as faixas de concentrações obtidas no presente trabalho são comparáveis aos valores reportados referentes a outras regiões do mundo.

7. Conclusões

O objetivo principal deste trabalho foi de otimizar uma metodologia de análise dos 5 esteróis fecais: coprostanol, epicoprostanol, colesterol, colestanol e β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de sedimentos. Analisando esses analitos nesse tipo de ambiente, possibilita avaliar se esses estão ou não contaminados por fezes. Neste trabalho, buscou-se também otimizar os processos tratamento das amostras e de derivatização para posterior análise por HPLC.

O processo de tratamento de amostra foi otimizado de forma a ser realizado em menor tempo sem perder a eficiência do processo. Para a análise de esteróis, foi necessária uma pequena quantidade de amostra de sedimento, 30 g. Com isso, utilizou-se menor quantidade de solventes gerando, assim, menor quantidade de resíduos ao fim do processo de tratamento das amostras.

A extração foi realizada em ultrassom, em três etapas de 30 minutos cada, utilizando a mistura de solventes: diclorometano e metanol, na proporção de 1:1. Em seguida, as amostras foram filtradas em pré-filtro de fibra de vidro (1 μ m) e derivatizadas com o reagente cloreto de benzoíla em meio de piridina. Esse reagente garantiu maior eficiência da reação e, conseqüentemente, maior sensibilidade do método. O processo de derivatização foi realizado em ultrassom por um tempo de 45 minutos que proporcionou maior rapidez e melhor rendimento da reação.

Os estudos de separação cromatográfica utilizando coluna de fase reversa C18, possibilitaram a separação dos 5 esteróis em comprimento de onda de detecção de 230 nm. As análises foram realizadas isocraticamente, utilizando a fase móvel ternária otimizada, composta pelos solventes metanol, tetraidrofurano e água nas proporções de 83/9/8 v/v, respectivamente. Conforme os parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar o método de análise por HPLC, os picos dos esteróis apresentaram resolução, simetria e fator de separação satisfatórios, em 26 minutos de análise.

Conforme os critérios de qualidade estabelecidos para a metodologia, os percentuais de recuperação dos compostos obtidos para amostras fortificadas foram satisfatórios. A média de recuperação dos compostos foi de 64,7 a 89,1%. Em todos os casos avaliados os desvios padrão relativos foram menores que 14%, não ultrapassando o valor de 30,0%, estabelecido como critério. Os resultados de recuperação da extração podem ser melhorados com a adição de padrão interno.

Os limites de detecção do método variaram entre 1,90 a 4,17 e os limites de quantificação, entre 3,79 a 8,94; expressos em mg.L⁻¹. Esses valores possibilitaram a aplicação da metodologia em amostras reais de sedimentos.

Com essa metodologia, foi possível avaliar e comprovar a contaminação por fezes nos 6 córregos afluentes do Rio Paraibuna, selecionados como locais de amostragem. De acordo com critérios das agências NOAA e U.S. EPA, a

metodologia analítica implementada mostrou-se eficiente e adequada para análise dos 5 esteróis estudados em amostras de sedimento lacustre.

REFERÊNCIAS

ABIDI, S., L., Capillary electrochromatography of sterols and related sterol esters derived from vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, Peoria, USA, v. 1059, p. 199-208, 2004.

ACESSA.COM 2010. Disponível em:

http://www.acesa.com/cidade/arquivo/noticias/2010/05/21-esgoto_agua/. Acesso em: 19 dez. 2010.

Ambiente Brasil. **Poluição da Água**. 2003. Disponível:

http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos_agua_doce/poluicao_da_agua.html. Acesso em: 19 dez. 2010.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BARBER, L. B.; WRITER, J. H. Impact of the 1993 Flood on the Distribution of Organic Contaminants in Bed Sediments of the Upper Mississippi River. **Environmental Science & Technology**, Colorado, USA, v. 32, p. 2077-2083, 1998.

BECK, M.; RADKE, M. Determination of sterols, estrogens and inorganic ions in waste water and size-segregated aerosol particles emitted from waste water treatment. **Chemosphere**, Oldenburg, Germany, v. 64, p.1134-1140, 2006.

BICUDO, C.E.M.; BICUDO, D.C. **Amostragem em Limnologia**. 2 ed. São Carlos: Rima, 2007.

BLOUNDI, M. K.; FAURE, P.; DUPLAY, J. Organic contamination identification in sediments from a Mediterranean coastal ecosystem: The case of the Nador lagoon (Eastern Morocco). **Comptes Rendus Geoscience**, Strasbourg, France, v. 340, p. 840-849, 2008.

BRASIL. PNUD, 2009. **Projeto Milênio das Nações Unidas**. Disponível em: <http://www.pnud.org.br/milenio/ft10.php>. Acesso em: 10/08/2009.

BRASIL. SNIS (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento). Diagnósticos dos Serviços de Água e Esgotos de 2008. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/PaginaCarrega.php?EWRErterterTERTer=85>. Acesso em: 15 jan. 2011.

CARREIRA, R. S.; RIBEIRO, P. V.; SILVA, C. E. M.; FARIAS, C. O. Hidrocarbonetos e Esteróis como Indicadores de Fontes e Destino de Matéria Orgânica em

Sedimentos da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Química Nova**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 32, n. 7, p. 1805-1811, 2009.

CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R.; READMAN, J. W. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space time variations. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 60, p. 587-598, 2004.

CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R.; READMAN, J. W.; FILEMAN, T. Distribuição de coprostanol ($5\beta(H)$ -Colestano- 3β -ol) em sedimentos superficiais da Baía de Guanabara: indicador da poluição recente por esgotos domésticos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 24, n. 1, p. 37-42, 2001.

BRASIL. Companhia de Saneamento Ambiental de Juiz de Fora. CESAMA, 2010. Disponível em: <http://www.cesama.com.br>. Acesso em: 18 dez. 2010.

CHOI, M.; MOON, H. B.; YU, J.; KIM, S. S.; PAIT, A. S.; CHOI, H. G. Nationwide monitoring of nonylphenolic compounds and coprostanol in sediments from Korean coastal Waters. **Marine Pollution Bulletin**, Pusan, South Korea, v. 58, p. 1086-1092, 2009.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Blucher, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2009.

COSTA, T. L. F.; ARAÚJO, M. P.; KNOPPERS, B. A.; CARREIRA, R. S. Sources and Distribution of Particulate Organic Matter of a Tropical Estuarine-Lagoon System from NE Brazil as Indicated by Lipid Biomarkers. **Aquatic Geochemistry**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 17, p. 1-19, 2011.

LUQUE-GARCIA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for Leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, Córdoba, Spain, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

ELHMMALI, M. M.; ROBERTS, D. J.; EVERSHED, R. P. Combined Analysis of Bile Acids and Sterols/Stanoles from Riverine Particulates To Assess Sewage Discharges and Other Fecal Sources. **Environmental Science & Technology**, Avon, England, v. 34, p. 39-46, 2000.

EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Comparação entre as extrações ultra-som e Soxhlet para determinação de alcanos em sedimentos ambientais. **Scientia Plena**, Sergipe, Brasil, v. 6, n. 9, p. 1-7, 2010.

FERNANDES, M. B.; SICRE, M. A.; CARDOSO, J. N.; MACEDO, S. J. Sedimentary sterols and n-alkanols in an eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil. **Science of the Total Environment**, Gif Sur Yvette, France, v. 231, p. 1-16, 1999.

FITZPATRICK, F.; SIGGIA, S. High Resolution Liquid Chromatography of Derivatized Non-Ultraviolet Absorbing Hydroxy Steroids. **Analytical Chemistry**, Massachusetts, USA, v. 45, n. 14, p. 2310-2314, 1973.

FRIELER, R. A.; MITTENESS, D. J.; GOLOVKO, M. Y.; GIENGER, H. M.; ROSENBERGER, T. A. Quantitative determination of free glycerol and myo-inositol from plasma and tissue by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Kansas, USA, v. 877, p. 3667-3672, 2009.

FROEHNER, S.; MACENO, M.; MARTINS, R. F. Sediments as a potential tool for assessment of sewage pollution in Barigui River, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, Paraná, Brazil, v. 170, p. 261-272, 2010.

FROEHNER, S.; MARTINS, R. F.; ERRERA, M. R. Assessment of fecal sterols in Barigui River sediments in Curitiba, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, Paraná, Brazil, v. 157, p. 591-600, 2009.

FROEHNER, S. J.; MARTINS, R. F. Avaliação da composição de sedimentos do rio Barigui na região metropolitana de Curitiba. **Química Nova**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 31, n. 8, p. 2020-2026, 2008.

GILL, F. L.; DEWHURST, R. J.; DUNGAIT, J. A. J.; EVERSLED, R. P.; IVES, L.; LI, C.; PANCOST, R. D.; SULLIVAN, M. ; BERA, S.; BULL, I. D. Archaeol – a biomarker for foregut fermentation in modern and ancient herbivorous mammals? **Organic Geochemistry**, Kolkata, Índia, v. 41, p. 467-472, 2010.

GILLI, G.; ROVERE, R.; TRAVERSI, D.; ACHILIRO, T.; PIGNATA, C. Faecal sterols determination in wastewater and surface water. **Journal of Chromatography B**, Torino, Itália, v. 843, p. 120–124, 2006.

GONZÁLEZ-OREJA, J. A.; SAIZ-SALINAS, J. I. Short-term spatio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, England, v. 36, p. 868-875, 1998.

GOURMELON, M.; CAPRAIS, M. P.; MIESZKIN, S.; MARTI, R.; WERY, N.; JARDE, E.; DERRIEN, M.; JADAS-HECART, A.; COMMUNAL, M. P.; JAFFREZIC, A.; POURCHER, A. M. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. **Water Research**, Plouzane, France, v. 44, p. 4812-4824, 2010.

GRASSI, M. T. As águas do Planeta Terra. **Cadernos Temáticos de Química nova na Escola**, Edição Especial – Maio, São Paulo, Brasil, p. 31-40, 2001.

GRIMALT, J.O.; FERNÁNDEZ, P.; BAYONA, J. M.; ALBAIGÉS, J. Assessment of fecal sterols and ketones as indicator of urban sewage inputs to coastal waters. **Environment Science Technology**, Barcelona, Spain, v. 24, p. 357-363, 1990.

GUIMARÃES, J. R.; NOUR, E. A. A. Tratando nossos esgotos: processos que imitam a natureza. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. Edição Especial – Maio 2001**, São Paulo, Brasil, p. 19-30, 2001.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. New York: LTC, 2005.

HJULSTROM, B.; ISAKSSON, S. Identification of activity area signatures in a reconstructed Iron Age house by combining element and lipid analyses of sediments. **Journal of Archaeological Science**, Stockholm, Sweden, v. 36, p. 174-183, 2009.

HONG, Y.; TUROWSKI, M.; LIN, J.; YOKOYAMA, W. H. Simultaneous Characterization of Bile Acid, Sterols, and Determination of Acylglycerides in Feces from Soluble Cellulose-Fed Hamsters Using HPLC with Evaporative Light-Scattering Detection and APCI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, USA, v. 55, p. 9759-9757, 2007.

HORI, Y.; FUJISAWA, M.; SHIMADA, K.; SATO, M.; KIKUCHI, M.; HONDA, M.; HIROSE, Y. Quantitative determination of glufosinate in biological samples by liquid chromatography with ultraviolet detection after *p*-nitrobenzoyl derivatization. **Journal of Chromatography B**, Niigata, Japan, v. 767, p. 255–262, 2002.

HU, J.; ZHANG, G.; LI, K.; PENG, P.; CHIVAS, A. R. Increased eutrophication offshore Hong Kong, China during the past 75 years: Evidence from high-resolution sedimentary records. **Marine Chemistry**, Guangzhou, China, v. 110, p. 7-17, 2008.

HUANG, W-Y.; MEINSCHEIN, W. G. Sterols as ecological indicators. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Bloomington, USA, v. 43, p. 739-745, 1979.

HUSSAIN, M.; FORD, R.; HILL, J. Determination of fecal contamination indicator sterols in an Australian water supply system. **Environmental Monitoring and Assessment**, Melbourne, Australia, v. 165, p. 147-157, 2010.

HYOTYLAINEN, T.; RIEKKOLA, M. L.; Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Helsinki, Finland, v. 26, n. 8, p. 788-808, 2007.

ISOBE, K. O.; TARAO, M.; ZAKARIA, M.; CHIEM, N.; MINH, LE Y.; TAKADA, H. Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography-mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. **Environmental Science Technology**. Can Tho Province, Vietnam, v. 36, p. 4497-4507, 2002.

JAKUBOWSKA, N.; ZYGMUNT, B.; POLKOWSKA, Z.; ZABIEGATA, B.; NAMIÉŚNIK, J. Sample preparation for gas chromatographic determination of halogenated volatile organic compounds in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, Gdansk, Poland, v. 1216, p. 422-441, 2009.

JARDÉ, E.; GRUAU, G.; MANSUY-HUAULT, L. Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading. **Applied Geochemistry**, Rennes Cedex, France, v. 22, p. 1814-1824, 2007.

KALAS, F. A.; CARREIRA, R. S.; MACKO, S. A. Molecular and isotopic characterization of the particulate organic matter from a eutrophic coastal bay in SE Brazil. **Continental Shelf Research**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 29, p. 2293-2302, 2009.

KAWAKAMI, S. K.; MONTONE, R. C. An efficient ethanol-based analytical protocol to quantify faecal steroids in marine sediments. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, Brasil, v. 13, p. 226-232, 2002.

KIYOSHIMA, A.; KUDO, K.; NISHIDA, N.; IKEDA, N. HPLC simultaneous determination of glycerol and mannitol in human tissues for forensic analysis. **Forensic Science International**, Fukuoka, Japan, v. 125, p. 127-133, 2002.

KWANG-HYOKI, S.; UI-NAM, P.; SARKAR, C.; BHADRA, R. A sensitive assay of red blood cell sorbitol level by high performance liquid chromatography: potential for diagnostic evaluation of diabetes. **Clinica Chimica Acta**, Kolkata, India, v. 354, p. 41-47, 2005.

LEEMING, R.; BALL, A.; ASHBOLT, N.; NICHOLS, P. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. **Pergamon**, West Ryde, Australia, v. 30, n. 12, p. 2893-2900, 1996.

LEEMING, R.; NICHOLS, P. D. Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. **Pergamon**, Hobart Tasmania, v. 30, n. 12, p. 2997-3006, 1996.

LI, D.; SHIM, W.; DONG, M.; OH, S. H. H. Application of nonylphenol and coprostanol to identification of industrial and fecal pollution in Korea. **Baseline/Marine Pollution Bulletin**, Jilin Province, China, v. 54, p. 97–116, 2007.

LI, D.; DONG, M.; SHIM, W. J.; YIM, U. H.; HONG, S. H.; KANNAN, N. Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. **Chemosphere**, South Korea, v. 71, p. 1162-1172, 2008.

LIEBEZEIT, G.; WOSTMANN, R. Coprostanol in Siak River Sediments, E Sumatra, Indonesia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Wilhelmshaven, Germany, v. 85, p. 585-588, 2010.

LOURENÇO, R. A. Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos em sedimentos – hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, esteróis e alquenonas. 2003. Dissertação (Mestrado Oceanografia Química e Geológica) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MACEDO, J. A. B. **Águas & Águas**. 3 ed. Belo Horizonte: Jorge Macedo, 2007.

MANAHAN, S.E. **Environmental Chemistry**. 8 ed. New York: CRC Press, 2004.

MAO, L.; SUN, C.; ZHANG, LI, Y.; WU, D. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with *p*-nitrobenzoyl chloride. **Analytica Chimica Acta**, Sichuan, China, v. 522, p. 241-246, 2004.

MARTINS, C. C.; BRAUN, J. A. F.; SEYFFERT, B. H.; MACHADO, E.C.; FILLMAN, G. Anthropogenic organic matter inputs indicated by sedimentary fecal steroids in a large South American tropical estuary (Paranagua estuarine system, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, Rio Grande do Sul, Brasil, v. 60, p. 2137-2143, 2010.

MARTINS, C. C.; GOMES, F. B. A.; FERREIRA, J. A.; MONTONE, R. C. Marcadores orgânicos de contaminação por esgotos sanitários em sedimentos superficiais da Baía de Santos, São Paulo. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 31, n. 5, p. 1008-1014, 2008a.

MARTINS, C. C. ; FERREIRA, J. A.; TANIGUCHI, S.; MAHIQUES, M. M.; BÍCEGO, M. C.; MONTONE, R. C. Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining shelf, SW Atlantic, Brazil: Origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin**, São Paulo, Brasil, v. 56, n. 7, p. 1359-1363, 2008b.

MARTINS, C. C.; FILLMANN, G.; MONTONE, R. C. Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos Lagoon, Brazil. **Journal Brazilian Chemical Society**, Paraná, Brasil, v. 18, p. 106-115, 2007.

MARTINS, C. C. Avaliação da introdução de esteróis fecais e hidrocarbonetos marcadores geoquímicos em sedimentos da Baía do Almirantado, Península Antártica. 2001. Dissertação (Mestrado Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MARTINS, R. F. Avaliação da presença de metais e de biomarcadores fecais em sedimentos do Rio Barigüi na região metropolitana de Curitiba-PR. 2008. Dissertação (Mestrado Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos)- Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

MATER, L.; ALEXANDRE, M. R.; HANSEL, F. A.; MADUREIRA, L. A. S. Assesment of lipid compounds and phosphorus in mangrove sediments of Santa Catarina Island, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Santa Catarina, Brasil, v. 15, n. 5, p. 725-734, 2004.

MUDGE, D.; DUCE, C. E. Identifying the source, transport path and sinks of sewage derived organic mater. **Environmental Pollution**, Oxford, England, v. 136, p. 209-220, 2005.

MUDGE, S. M.; LINTERN, D. G. Comparison of Sterol Biomarkers for Sewage with other Measures in Victoria Harbour, B.C., Canada. **Estuarine, Coastal and Shelf Science, Anglesey**, UK, v. 46, p. 27-38, 1999.

MUDGE, S. M.; SEGUEL, C. G. Organic contamination of San Vicente Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, England, v. 38, n. 11, p. 1011-1021, 1999.

MUDGE, S. M.; BEBIANNO, M. J. Sewage contamination following an accidental spillage in the Ria Formosa, Portugal. **Marine Pollution Bulletin**, Faro, Portugal, v. 34, n. 3, p. 163-170, 1997.

MUDGE, S. M.; NORRIS, C. E. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. **Marine Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 57, p. 61-84, 1997.

MUNIZ, P.; PIRES-VANIN, A. M. S.; MARTINS, C. C.; MONTONE, R. C.; BÍCEGO, M. C. Trace metals and organic compounds in the benthic environment of a subtropical embayment (Ubatuba Bay, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, São Paulo, Brasil, v. 52, n. 9, p. 1098-1105, 2006.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA 1998). Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: 1993-1996 Update. Disponível em: <http://ccma.nos.noaa.gov/publications/tm130.pdf>. Acesso em 16 out. 2010.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. 3 ed. Campinas: UNICAMP, 2007.

NGUYEN, D., BRUCHET, A.; ARPINO, P. Determinations of Sterols in Sewage Sludge by Combined in Situ Trimethylsilylation/Supercritical Fluid Extraction and GC/MS. **Environmental Science & Technology**, Paris, France, v. 29, p. 1686-1690, 1995.

NICHOLS, P. D.; LEEMING, R.; RAYNER, M. S.; LATHAM, V. Use of capillary gas chromatography for measuring fecal-derived sterols application to stormwater, the sea-surface microlayer, beach greases, regional studies, and distinguishing algal blooms and human and non-human sources of sewage pollution. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, Netherlands, v. 733, p. 497-509, 1996.

NOJIRI, S.; TAGUCHI, N.; OISHI, M. e SUZUKI, S. Determination of sugar alcohols in confectioneries by high-performance liquid chromatography after nitrobenzoylation. **Journal of Chromatography A**, Tokyo, Japan, v. 893, p. 195-200, 2000.

Non-Ultraviolet Absorbing Hydroxy Steroids. **Analytical Chemistry**, Massachusetts, USA, v. 45, n. 14, p. 2310-2314, 1973.

OZDESTAN, O.; UREN, A. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. **Talanta**, Bornova Izmir, Turkey, v. 78, p. 1321-1326, 2009.

PENG, X.; ZHANG, G.; MAI, B.; HU, J.; LI, K.; WANG, Z. Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China Sea using sterols and other organic molecular markers. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, England, v. 50, p. 856-865, 2005.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, Pernambuco, Brasil, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1995.

PIOCOS, E. A.; CRUZ, A. de la. Solid phase extraction and high performance liquid chromatography with photodiode array detection of chemical indicators of human fecal contamination in water. **Journal Liquid Chromatography & Related Technologies**, Ohio, USA, v. 23, n. 8, p. 1281-1291, 2000.

POERSCHMANN, J.; FABBRI, D.; GORECKI, T. Investigation of the solvent extracts of humic organic matter (HOM) isolated from the Ravenna Lagoon to study environmental pollution and microbial communities. **Chemosphere**, Leipzig, Germany, v. 70, p. 206-214, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; CARDOSE, A.A. **Introdução à Química Ambiental**. São Paulo: Artmed, 2006.

SANTOS, E. S.; CARREIRA, R. D.; KNOPPERS, B. A. Sedimentary sterols as indicator of environmental conditions in Southeastern Guanabara Bay, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 56, n. 2, p. 96-113, 2008.

SAVITCHCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, Hokkaido, Japan, v. 40, p. 2463-2476, 2006.

SERICANO, J. L. Quantitative determination of chlorinated hydrocarbons by gas chromatography/electron capture detection in Geochemical and Environmental Research Group. **Standard Operating Procedures**, SOP 9810, revision n. 1, October 29, p. 1-21, 1998.

SHAH, V. G.; DUNSTAN, R. H.; GEARY, P. M.; COOMBES, P.; ROBERTS, M. K.; VON, NAGY-FELSOBUKI, E. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. **Water Research**, Newcastle, Australia, v. 41, p. 3691-3700, 2007.

SINGH, S. P.; AZUA, A.; CHAUDHARY, A.; KHAN, S.; WILLETT, K. L.; GARDINALI, P. R. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. **Ecotoxicology**, Miami, USA, v. 19, p. 338-350, 2010.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOUZA, R. C., (2008). Metodologia para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos e solos periféricos à represa São Pedro – Juiz

de Fora, MG. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

STEFENS, J.L.; dos SANTOS, J. H. Z.; MENDONE, J. G.; da SILVA, C. G. A.; PERALBA, M. D. R. Lipid biomarkers profile – presence of coprostanol: recent sediments from Rodrigo de Freitas Lagoon - Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Environmental Science and health Part A – Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, Rio Grande do Sul, Brasil, v. 42, p. 1553-1560, 2007.

TACHE, F.; DAVID, V.; FARCA, A.; MEDVEDOVICI, A. HPLC-DAD determination of Metformin in human plasma using derivatization with *p*-nitrobenzoyl chloride in a biphasic system. **Microchemical Journal**, Bucharest, Romania, v. 68, p. 13-19, 2001.

TYAGI, P.; EDWARDS, D. R.; COYNE, M. S. Fecal Sterol and Bile Acid Biomarkers: Runoff Concentrations in Animal Waste-Amended Pastures. **Water Air and Soil Pollution**, Lexington, USA, v. 198, p. 45-54, 2009.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY a. U.S. EPA 3540C 1996: SOXHLET EXTRACTION. Disponível em: www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf. Acesso em: 15 out. 2010.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY b. U.S. EPA 3550B 1996: Ultrasonic Extraction. Disponível em: <http://www.trincoll.edu/~henderson/textfi~1/416%20notes/3550b.pdf>. Acesso em: 15 out. 2010.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. U.S. EPA 3550C 2007: Ultrasonic Extraction. Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550c.pdf>. Acesso em: 15 out. 2010.

VENKATESAN, M. I.; KAPLAN, I. R. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica Basin, Southern California. **Environment Science & Technology**, Los Angeles, USA, v. 24, p. 208-214, 1990.

VENKATESAN, M. I.; MERINO, O.; BAEK, J.; NORTHRUP, T.; SHENG, Y.; SHISKO, J. Trace organic contaminants and their sources in surface sediments of Santa Monica Bay, California, USA. **Marine Environmental Research**, Los Angeles, USA, v. 69, p. 350-362, 2010.

VENKATESAN, M. I.; SANTIAGO, C. A. Sterols in ocean sediments – Novel tracers to examine habitats of Cetaceans, Pinnipeds, Penguins and Humans. **Marine Biology**, Los Angeles, USA, v. 102, n. 4, p. 431-437, 1989.

WALKER, R. C.; WUN, C. K.; LISKY, W. Coprostanol as an indicator of faecal pollution. **CRC Critical Reviews in Environment Control**, v. 12, p. 91-112, 1982.

WU, J. M.; HU, R. K.; YUE, J. Q.; YANG, Z. G.; ZHANG, L. F. Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. **Journal of Chromatography A**, Singapore, Singapore, v. 1216, p. 1053-1058, 2009.

ZARZYCKI, P.; KULHANEK, K. M.; SMITH, R.; CLIFTON, V. L. Determination of steroids in human plasma using temperature-dependent inclusion chromatography for metabolomic investigations. **Journal of Chromatography A**, NSW, Australia, v. 1104, p. 203–208, 2006.

ZHANG, C.; WANG, Y.; QI, S. Identification and significance of sterols in MSWlandfill leachate. **Journal of Chromatography B**, Wuhan, China, V. 874, p. 1-6, 2008.