

MARCADORES QUÍMICOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Caroline Lima de Oliveira ⁽¹⁾

Bacharel em química pela Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho (UNESP). Mestranda pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Elaine Arantes Jardim Martins ⁽²⁾

Pesquisadora pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Hélio Akira Furusawa ⁽³⁾

Pesquisador pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Marycel Elena Barboza Cotrim ⁽⁴⁾

Pesquisadora pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Endereço ⁽¹⁾: Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - São Paulo – SP - CEP:05508-000 – Brasil - Tel: (13)9121-1562 - e-mail: lollima@usp.br.

RESUMO

Cerca de um bilhão de litros de esgotos domésticos, praticamente sem tratamento, são despejados diariamente na bacia do Paraíba do Sul. Alguns esteróis podem ser utilizados como marcadores químicos de efluentes domésticos sendo aplicados para examinar o histórico de distribuição do esgoto bem como o seu transporte no ambiente aquático. Este trabalho apresenta a metodologia desenvolvida e validada para identificação do colesterol, coprostanol, colestanol e estigmasterol em amostras de águas superficiais da região paulista do Rio Paraíba do Sul, utilizando a técnica de SPE para extração e concentração da amostra com posterior derivatização e análise por CG/EM. Após o processo de validação, a metodologia desenvolvida se mostrou adequada para a identificação e quantificação dos esteróis em virtude de sua exatidão, precisão, robustez e recuperação. Aplicando o método validado para as amostras de água bruta coletadas, observou-se a ocorrência dos analitos de estudo, proporcionando uma avaliação precisa da área estudada e contribuindo com o plano de gestão de recursos hídricos da região do Rio Paraíba do Sul, SP. Esta pesquisa está vinculada a uma parceria entre o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) de São José dos Campos.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores químicos, Recursos hídricos, Rio Paraíba do Sul.

INTRODUÇÃO

A população mundial triplicou nos últimos 100 anos e a demanda por água limpa se multiplicou por seis. O Brasil ostenta certa abundância, porém 75% da água dos seus 12 mil rios e córregos estão na região norte, na bacia do Amazonas, região onde vive apenas 6% da população. Este cenário contrasta, por exemplo, com o estado de São Paulo, região metropolitana, que possui mais de 20% da população brasileira e menos de 2% da água com qualidade do País (Água, 2011).

A escassez dos recursos hídricos com qualidade em regiões metropolitanas do Brasil se deve, entre outros fatores, à falta da preservação dos mananciais causada pela contaminação gerada pelos efluentes da população urbana, que são o esgoto doméstico, industrial e pluvial (Tucci, 2008).

Diversos estudos apresentam o uso de marcadores químicos de contaminação fecal como uma alternativa aos métodos microbiológicos mais comumente utilizados para caracterizar o aporte de esgoto doméstico em águas superficiais, pois são menos suscetíveis às mudanças ambientais (Murtaugh e Bunch, 1967; Leeming e Nichols, 1996; Maldonado *et al.*, 2000; Pratt, 2005; Araújo *et al.*, 2011). Os compostos da classe dos esteróis são os marcadores químicos mais utilizados, devido à especificidade com material fecal de origem humana (Martins *et al.*, 2008).

O uso de esteróis como indicadores de contaminação fecal, é particularmente aplicável a regiões próximas a centros urbanos e à atividade industrial e agropecuária, onde é possível identificar fontes de descarga de efluentes, muitas vezes tratados apenas primariamente (Martins, 2001; Martins *et al.*, 2008). Atualmente, aproximadamente um bilhão de litros de esgotos domésticos, praticamente sem tratamento, são despejados diariamente na bacia do Paraíba do Sul (CEIVAP-AGEVAP, 2009).

Em virtude do contexto apresentado, o presente estudo analisou a distribuição do colesterol, coprostanol, colestanol e estigmasterol em águas superficiais provenientes das estações de tratamento de água (ETAs) dos municípios de Guararema, Taubaté, São José dos Campos e Pindamonhangaba, pertencentes à parcela paulista da bacia do Rio Paraíba do Sul. Esses municípios são caracterizados pela presença de inúmeros problemas ambientais que crescem a cada ano, devido ao crescimento populacional causado pelo intenso desenvolvimento das atividades urbano-industriais e agropecuárias, expressando-se em danos à qualidade dos recursos hídricos (Tucci, 2008).

A metodologia desenvolvida para a identificação de esteróides derivados do colesterol nas amostras de água superficial foi validada a partir da avaliação dos principais parâmetros de desempenho, sendo eles: seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), faixa de trabalho, recuperação, precisão, exatidão e robustez. Todos os parâmetros foram avaliados de acordo com o procedimento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2003; INMETRO, 2007).

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de marcadores químicos da classe dos esteróis em amostras de água superficiais coletadas na Região do Rio Paraíba do Sul, SP, utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização das análises dos compostos coprostanol, colestanol, colesterol e estigmasterol, amostras de água superficiais foram coletadas (CETESB, 1987) nas estações de tratamento de água (ETA) de 4 municípios na região do Rio Paraíba do Sul: Guararema, Pindamonhangaba, São José dos Campos e Taubaté.

As amostras foram filtradas com membranas de 0,45 µm, acidificadas a pH 3 e pré-concentradas em sistema de extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de polipropileno preenchidos com octadecil (C18) polimericamente ligado, da marca Supelco.

O cartucho SPE foi condicionado com 5 mL de Metanol (100%) seguidos de 5 mL de Metanol:Água na proporção 1:9. A etapa seguinte envolveu a percolação de 1L das amostras sob um fluxo constante e contínuo de aproximadamente 5 mL.min⁻¹. Após a percolação, foi realizada a etapa de *clean-up* (lavagem) em que foram utilizados 5 mL de Metanol:Água na proporção 1:9 a fim de remover possíveis interferentes. Para a remoção de toda a água presente no cartucho, o mesmo foi mantido primeiramente por 10 minutos sob vácuo e em seguida centrifugado por 30 minutos a 2500 rpm.

A eluição dos esteróis de estudo retidos no cartucho foi realizada com 5 mL da mistura Diclorometano:Metanol na proporção 6:4. Os extratos foram levados a secura total sob fluxo suave de nitrogênio.

Ao extrato seco, foi adicionada uma alíquota de 100 µL do derivatizante BSTFA:TMCS (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida:Trimetilclorosilano) (99:1) e a derivatização foi realizada a 100°C por 30 minutos. Os derivados trimetil-silílicos obtidos foram retomados em diclorometano (100%) até o volume de 1 mL e analisado no Cromatógrafo a gás, *Shimadzu GC-17Ai* acoplado ao detector de espectrometria de massas, *Shimadzu-QP5000* (CG/EM).

A injeção manual de 1 µL foi feita sem divisão de fluxo (*splitless*) com injetor a 300°C e coluna capilar DB-5 (26 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm). Na programação da temperatura utilizou-se: início a 150°C, incrementos de 40°C.min⁻¹ até 300°C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. Hélio foi usado como gás de arraste, mantido em fluxo constante na coluna a 1,7 mL.min⁻¹.

O detector de massas operou nos modos varredura de uma faixa determinada de íons (SCAN) e Monitoramento Seletivo de Íons (SIM), monitorando 5 fragmentos específicos para cada composto estudado (Tabela 1), com energia de ionização dos fragmentos de 70 eV e voltagem 2,5 kV.

Tabela 1: Íons monitorados em CG/EM para os derivados trimetil-silílicos dos esteróis no modo SIM

Derivados Trimetil-silílicos	Faixa de tempo (minutos)	Relação massa/carga				
		Ch 1	Ch 2	Ch 3	Ch 4	Ch 5
Coprostanol	6.90 – 8.45	207	215	257	355	370
Colesterol	8.45 – 9.40	129	145	329	368	458
Colestanol	8.45 – 9.40	75	215	355	445	460
Estigmasterol	10.90 – 14.00	129	255	355	394	484

Conforme já citado anteriormente, a validação da metodologia foi realizada a partir da avaliação estatística dos seguintes parâmetros analíticos: robustez, seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, recuperação e incerteza segundo INMETRO (2003) e suas revisões de 2007, 2010 e 2011.

As injeções foram realizadas em sete replicatas de oito concentrações de todos os compostos nos ensaios com e sem matriz. Para observar a seletividade, utilizou-se o teste *t-Student* que objetiva avaliar a significância das diferenças das médias; teste de inclinação e paralelismo; teste do intercepto e teste *F-Snedecor* que avalia a homogeneidade das variâncias evidenciando se há interferência da matriz nas análises. A linearidade foi avaliada por meio dos coeficientes de determinação (r^2) obtidos pelas curvas analíticas de todos os compostos de estudo.

A exatidão foi avaliada pelo índice *z* (*z Score*). A precisão foi avaliada pelos limites de reprodutibilidade e repetitividade. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados segundo o documento do INMETRO (2011). A robustez foi determinada aplicando-se o teste que consiste no planejamento fatorial de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado) de acordo com os parâmetros apresentados na Tabela 2 (Furusawa, 2007; Vander Heyden *et al.* 2001).

Tabela 2: Parâmetros selecionados para os testes de robustez

Fator	Clean-up	pH da amostra	Temp. derivatização (°C)	Temp. injetor (°C)	Temp. interface (°C)	Fluxo coluna (mL.min ⁻¹)	Voltagem detector (kV)
Nominal	sim	3	100	300	300	1,7	2,5
Varição	não	Original	70	280	280	1,5	2,3

A recuperação (Rec) foi avaliada a partir da fortificação da amostra de água superficial, ou seja, na adição de soluções com níveis baixo, médio e alto dos esteróis seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calculou-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Rec} = (\text{Valor obtido} - \text{Valor real}) / (\text{Valor real}) * 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Neste estudo, foram utilizados os pontos referentes às concentrações apresentadas na Tabela 5 sendo os testes realizados em triplicata.

RESULTADOS

A seletividade e especificidade da metodologia desenvolvida foram avaliadas inicialmente pela observação do cromatograma dos compostos na matriz de água bruta (Figura 01) e apenas em solvente (Figura 02). Para este teste, os compostos foram avaliados em diferentes concentrações de acordo com a sensibilidade, na faixa de 0,4 µg.mL⁻¹ a 1 µg.mL⁻¹, tanto na matriz de água superficial como apenas em solvente para que fosse possível a comparação das intensidades dos sinais.

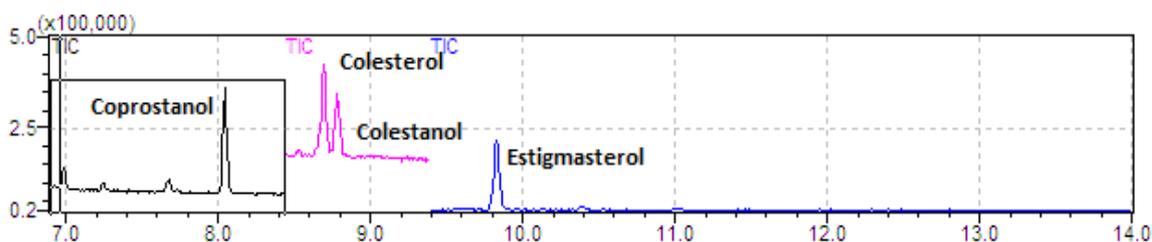


Figura 1: Cromatograma da mistura dos compostos estudados na matriz de água superficial obtido no modo SIM

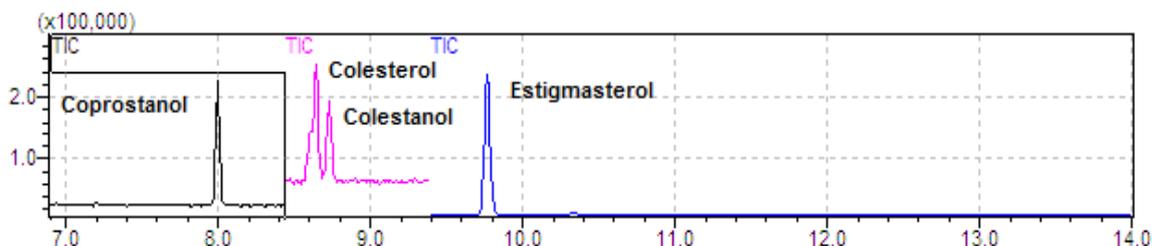


Figura 2: Cromatograma da mistura dos compostos estudados em solventes obtido no modo SIM

Analisando os cromatogramas, observa-se a perfeita separação de todos os picos, evidenciando uma boa seletividade do método. Nota-se ainda que há influência da matriz na sensibilidade dos compostos, pois os sinais analíticos de todos os compostos foram mais intensos na matriz de água superficial do que apenas na mistura de solventes.

Os resultados obtidos pelo teste F (*Snedecor*) e teste t (*Student*), nas medidas de adição padrão nos ensaios com e sem matriz, foram comparados respectivamente com os valores tabelados de $F_{6,6, 95\%} = 4,28$ e $t_{12, 95\%} = 2,179$. Nos ensaios em questão, todos os compostos apresentaram valores de t e F superiores aos valores tabelados indicando que a matriz interfere na precisão do método evidenciando que a quantificação deve ser realizada em uma curva preparada na própria matriz.

A linearidade do método para a matriz de água superficial foi comprovada pelos valores de coeficiente de determinação (r^2) (Tabela 3) e de acordo com o recomendado pelo INMETRO (2003) os valores de coeficiente de correlação (r) deve estar acima de 0,90, o que significaria um $r^2 = 0,81$.

Tabela 3: Coeficiente de determinação para os derivados trimetil-silílicos na matriz de água superficial.

Derivados Trimetil-silílicos	r^2
Coprostanol	0,998
Colesterol	0,992
Colestanol	0,999
Estigmasterol	0,997

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os compostos de estudo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Limites de detecção e de quantificação da metodologia desenvolvida.

Derivados Trimetil-silílicos	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Coprostanol	0,029	0,215
Colesterol	0,080	0,250
Colestanol	0,032	0,162
Estigmasterol	0,031	0,134

A exatidão foi avaliada pelo índice z, em que valores de $z < 2$ indicam um resultado satisfatório. Os resultados dos testes para todos os compostos do presente estudo apresentaram valores de z abaixo do especificado evidenciando a exatidão do método.

Cada ensaio combinado do planejamento fracionário saturado para robustez gerou resultados que representam a influência que cada fator exerce sobre o composto analisado. Esses resultados foram explorados por meio dos gráficos de significância dos efeitos (Figura 03) e *Rankit* (Figura 04).

Os quatro compostos apresentaram perfis semelhantes (Figura 03), pois o fator de maior influência positiva para todos foi o pH da amostra. Apenas o coprostanol apresentou resultado um pouco diferente, pois os parâmetros temperatura do injetor e *clean-up* apresentaram influências ligeiramente negativas.

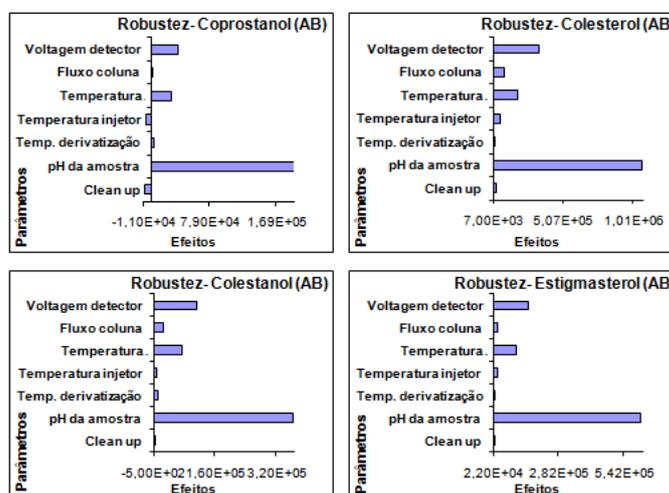


Figura 3: Representação gráfica do teste de verificação da significância dos efeitos para o coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol na matriz de água superficial.

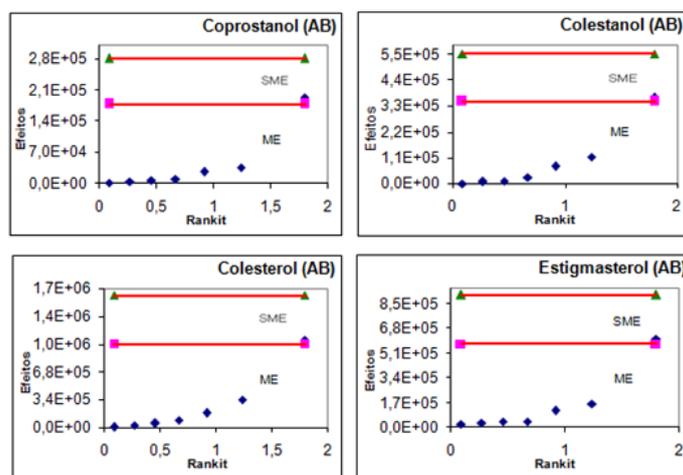


Figura 4: Gráficos de *rankit* para coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol na matriz de água superficial.

Quando um fator gera uma influência positiva, sugere que a alteração do mesmo na metodologia possa favorecer a análise dos compostos de interesse. Porém, analisando os resultados dos gráficos de *Rankit* (Figura 04) para os compostos na matriz de água superficial, apenas o parâmetro pH da amostra apresentou valor muito próximo do limite mais crítico ME (*Margin of error*). Essa informação sugere que o parâmetro em questão encontra-se em uma região de atenção, ou seja, pode eventualmente exercer influência no processo de análise. Logo, essa variável deve estar sob controle durante toda a análise (Furusawa, 2007). Entretanto, nem mesmo este parâmetro compromete a robustez, visto que ainda está abaixo do SME (*Simultaneous margin of error*).

O parâmetro recuperação apresentou valores satisfatórios (Tabela 5) para os três níveis de fortificações aplicados.

Tabela 5. Resultados dos estudos de recuperação na matriz de água superficial (AS) considerando três níveis de fortificação (n=3).

Derivados Trimetil-silílicos	Recuperação – Matriz AS					
	Nível Baixo ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Rec %	Nível Médio ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Rec %	Nível Alto ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Rec %
Coprostanol	0,25	112,6	2,0	65,4	7,0	111,5
Colesterol	0,1	153,9	0,8	60,2	2,8	101,6
Colestanol	0,2	92,2	1,6	63,0	5,6	99,4
Estigmasterol	0,2	119,3	1,6	63,3	5,6	93,2

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de traços geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani *et al.*, 2004).

Os valores de recuperação dos analitos na matriz de água superficial se encontraram na faixa de 60,2% a 153,9% indicando uma adequada recuperação do método desenvolvido. Foi possível também observar que a semelhança química dos compostos de estudo gerou valores de recuperação próximos.

Encontrou-se uma recuperação acima do recomendado apenas para o colesterol em nível baixo de fortificação. A presença natural deste analito na matriz é relevante sugerindo a possível causa de uma recuperação excessiva devido à provável interferência causada no sinal analítico.

Com a metodologia desenvolvida e validada, a ocorrência e a concentração dos analitos de estudo nas amostras de água superficial dos quatro municípios abastecidos pelo Rio Paraíba do Sul foi determinada. As coletas foram realizadas nos meses de junho, outubro e dezembro de 2011 contemplando épocas seca e chuvosa. Os valores encontrados (Tabela 6) são referentes às médias das triplicatas mais o valor das incertezas associadas.

Tabela 6. Resultados das análises das coletas das amostras de água superficial (AS) dos quatro municípios da região do rio Paraíba do Sul.

1ª Coleta – Junho de 2011 - Concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$ na amostra de 1L				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ASG	0,480 \pm 0,048	< 0,250	0,213 \pm 0,034	0,102 \pm 0,019
AST	0,796 \pm 0,017	1,829 \pm 0,019	0,419 \pm 0,011	0,207 \pm 0,010
ASP	1,011 \pm 0,018	0,710 \pm 0,020	0,596 \pm 0,009	0,223 \pm 0,016
ASSJC	0,824 \pm 0,077	1,040 \pm 0,005	0,399 \pm 0,009	0,157 \pm 0,009
2ª Coleta – Outubro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$ na amostra de 1L				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ASG	< LD	< 0,250	< LD	< 0,134
AST	<0,215	< 0,250	< LD	< LD
ASP	<0,215	< 0,250	< LD	< LD
ASSJC	<0,215	0,577 \pm 0,126	< LD	<0,134
3ª Coleta – Dezembro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$ na amostra de 1L				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ASG	0,455 \pm 0,068	0,288 \pm 0,039	0,523 \pm 0,085	< 0,134
AST	< 0,215	0,271 \pm 0,068	< LD	< LD
ASP	< LD	0,393 \pm 0,077	< LD	< LD
ASSJC	< LD	< 0,250	0,291 \pm 0,039	< LD

LD: Limite de detecção do método.

ASP: Água superficial de Guararema.

AST: Água superficial de Taubaté.

ASP: Água superficial de Pindamonhangaba.

ASSJC: Água superficial de São José dos Campos.

Foi observada nas amostras de água superficial a ocorrência de todos os esteróis de estudo, porém os níveis de contaminação foram maiores na primeira coleta devido à baixa pluviosidade ocorrida durante o mês de junho diminuindo a diluição dos mesmos no corpo hídrico.

Diversos autores também observaram a ocorrência dos esteróis em questão em amostras de águas superficiais, todavia, os valores encontrados foram superiores aos encontrados na região do rio Paraíba do Sul (Singh *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2009; Gilli *et al.*, 2006; Ghiselli, 2006; Wenzel *et al.*, 2003; Cathum e Sabik, 2001).

A presença dos isômeros coprostanol e colestanol, ambos marcadores de contaminação fecal, indica que pode haver descarga de esgoto doméstico nas águas superficiais de estudo, pois parte do esgoto coletado nos municípios avaliados retorna ao corpo hídrico sem tratamento ou ainda contaminado com os compostos que não sofreram degradação nas estações de tratamento de esgoto (ETEs).

A presença do colesterol é justificada por fontes tanto naturais quanto antrópicas, portanto não pode ser utilizado como indicador direto de contaminação por esgotos (Martins *et al.*, 2008; Braun, 2006). A ocorrência do fitoesteróide estigmasterol nas amostras de água bruta se dá por meio da contribuição vegetal e pelo descarte de efluentes pecuários (Saim *et al.*, 2009).

Atualmente, não há legislação nacional ou internacional que contemple os esteróis de estudo em água superficiais. Alguns autores propuseram níveis máximos para contato primário e secundário em águas superficiais apenas para o esteróide coprostanol correlacionando a concentração do mesmo com resultados de ensaios microbiológicos (Leeming e Nichols, 1996; Nichols *et al.*, 1992). Relações entre o coprostanol e os demais esteróis têm sido aplicadas com o intuito de compreender o grau de contaminação da área estudada (Grimalt *et al.*, 1990; Chalaux *et al.*, 1995; Marvin *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2008).

Com os resultados obtidos foi possível caracterizar a área de estudo com relação a contaminação fecal. Porém, um número maior de amostragens deve ser estudado para que esta tendência seja confirmada e, com isso, atestar sobre a eficiência do tratamento realizado pelas ETEs da SABESP.

CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida se mostrou adequada para a identificação e quantificação dos esteróis de estudo em virtude de sua exatidão, precisão, robustez e recuperação do método. O processo de validação forneceu confiabilidade estatística, confirmando a sensibilidade e a seletividade do método, além da boa linearidade nas faixas de trabalho consideradas.

Foi possível com o uso da metodologia desenvolvida, identificar a contaminação das amostras de água superficial pelos esteróis coprostanol, colestanol, colesterol e estigmasterol. Estes resultados proporcionaram uma avaliação satisfatória da área de estudo, o que pode contribuir com o plano de gestão de recursos hídricos da região paulista do rio Paraíba do Sul, indicando o nível de contaminação provavelmente gerado pelo aporte de esgoto doméstico nas águas superficiais.

RECOMENDAÇÕES

Como recomendações futuras, o presente estudo sugere um número maior de amostragens com intuito de avaliar o impacto ambiental causado na região em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÁGUA, sem ela não dá. Revista TAE: Especializada em tratamento de água e efluentes, n. 1, p. 30-32, 2011.
2. ARAUJO, M. P.; COSTA, T. L. F.; CARREIRA, R. S. Esteróis como indicadores do acúmulo de esgotos domésticos em sedimentos de um sistema estuarino-lagunar tropical (Mundaú-Manguaba, AL). Química Nova, v. 34; n. 1; p. 64-70, 2011.
3. BRAUN, J. A. F. Uso de esteróides na avaliação de aportes antrópicos e naturais da matéria orgânica no Complexo Estuarino de Paranaguá. 2006. Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.
4. CATHUM, S; SABI, H.; TRAVERSI, D.; SCHILIRO, T.; P, C. Determination of Steroids and Coprostanol in Surface Water, Effluent and Mussel Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Chromatographia, v. 53, p. 394-399, 2001.
5. CEIVAP – AGEVAP. Relatório de situação: bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul 2008-2009. Resende, RJ: CEVAP – AGEVAP, 2009
6. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Guia de coleta e preservação de amostras de água. 1987.
7. CHALAU, N.; TAKADA, H. e BAYONA, J. M. Molecular markers in Tokyo bay sediments: sources and distribution. Marine Environmental Research, v.40, n.1, p. 77-92, 1995.

8. FURUSAWA, H. A. Validação de Ensaios Químicos. São Paulo, IPEN-CNEN/SP, 2007 (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO).
9. GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de Campinas, São Paulo.
10. GILLI, G.; ROVERE, R.; TRAVERSI, D.; SCHILIRO, T.; P, C. Faecal sterols determination in wastewater and surface water. *Journal of Chromatography B*, v. 842, p. 120-124, 2006.
11. GRIMALT, J. O.; FERNÁNDEZ, P.; BAYONA, J.M.; ALBAIGÉS, J. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environmental Science & Technology*, v. 24, n. 3, p. 357-363, 1990.
12. INMETRO – Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01. Mar. 2003.
13. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 02. Jun. 2007.
14. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03. Fev. 2010.
15. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04. Fev. 2011.
16. LEEMING, R.; NICHOLS, P. D. Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. *Water Research.*, v. 30, n. 12, p. 2997-3006, 1996.
17. MALDONADO, C.; VENKATESAN, M. I.; PHILLIPS, C. R.; BAYONA, J. M. Distribution of Trialkylamines and Coprostanol in San Pedro Shelf Sediments Adjacent to a Sewage Outfall. *Marine Pollution Bulletin*, v. 40, n. 8, p. 680-687, 2000.
18. MARTINS, C.C. Avaliação de introdução de esteróides fecais e hidrocarbonetos marcadores geoquímicos em sedimentos da baía da Almirantado, Península Antártica. 2001. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, São Paulo.
19. MARTINS, C.C.; AZEREDO, F.A.A.; FERREIRA, J.A.; MONTONE, R.C. Marcadores de contaminação por esgotos sanitários em sedimentos superficiais da baía de Santos, São Paulo. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 1008-1014, 2008.
20. MARVIN, C., COAKLEY, J., MAYER, T., BROWN, M., THIESSEN, L. Application of faecal sterol ratios in sediments and effluents as source tracers. *Water Qual. Res. J. Canadá*, v. 36, n. 4, p. 781-792, 2001.
21. MURTAUGH, J. J. and BUNCH, R. L. Sterols as a measure of faecal pollution. *Research Journal Water Pollution*. v. 39, p. 404-409, 1967.
22. NICHOLS, P. D.; LEEMING, R.; RAYNER, M. S.; LATHAM, V.; ASHBOLT, N. J.; TURNER, C. Comparison of the abundance of the faecal sterol coprostanol and faecal bacterial groups in inner-shelf waters and sediments near Sydney, Australia. *J. Chromatog.* v. 643, p. 189-195, 1992.
23. PRATT, C. Investigations into faecal sterols and *E. coli* as indicators of sewage and non-sewage inputs into a subtropical estuarine embayment system in South Eastern QLD, Australia. 2005. Tese (Doctor of Philosophy) – Department of Environmental and Applied Sciences, Griffith University, Queensland.
24. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
25. SAIM, N.; OSMAN, R.; SPIAN, D. R. S. A.; JAAFAR, M. Z.; JUAHIR, H.; Abdullah, M.; GHANI, F. A. Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer for faecal contamination in water. *Water Research*, v. 43, p. 5023-5030, 2009.
26. 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*, v. 19, p. 338–350, 2010.
27. TUCCI, C.E.M. Águas urbanas. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 63, 2008.
28. VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. *J. pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 24, p. 723-753, 2001.
29. WENZEL, A., MÜLLER, J., & TERNES, T.A. Study on endocrine disrupters in drinking water, 2003. Disponível em: <http://ec.europa.eu/research/endocrine/pdf/drinking_water_en.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2012.
30. WU, J.; HU, R.; YUE, J.; YANG, Z.; ZHANG, L. Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 1053–1058, 2009.