

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
APLICADA

JULIANA APARECIDA DA SILVA

DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS
COMO INDICADOR DE CONTAMINAÇÃO POR ESGOTO DOMÉSTICO

PONTA GROSSA
2016

JULIANA APARECIDA DA SILVA

DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS
COMO INDICADOR DE CONTAMINAÇÃO POR ESGOTO DOMÉSTICO

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth W. O. Scheffer

PONTA GROSSA
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S586 Silva, Juliana Aparecida da
Determinação de cafeína em águas superficiais como indicador de contaminação por esgoto doméstico/ Juliana Aparecida da Silva. Ponta Grossa, 2016. 96f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth W. O. Scheffer.

1.Cafeína. 2.Águas superficiais. 3.Efluente. 4.CLAE. I.Scheffer, Elizabeth W. O.. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Química Aplicada. III. T.

CDD: 541.1

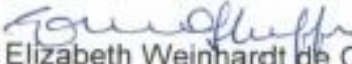
TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA APARECIDA DA SILVA

"DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS COMO INDICADOR DE CONTAMINAÇÃO POR ESGOTO DOMÉSTICO"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:


Profa. Dra Elizabeth Weinhardt de Oliveira Scheffer
UEPG/PR


Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos
UEPG/PR


Prof. Dr. César Arthur Martins Chornobai
UTFPR/PR

Ponta Grossa, 05 de setembro de 2016.

Dedico este trabalho ao meus esposo Juarez, meu filho Nicolás, meus pais Ana e Antônio (*in memoriam*), à minha irmã Janaina e meus irmão Moacir e Marcelo, que são a base da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e sempre permitir que eu seja persistente e forte nos momentos de dificuldades.

Ao meu esposo, Juarez, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido mais viva de verdade. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia. Por seu suporte e amor incondicional, me dando força e coragem para continuar.

Ao meu filho Nicolás, que embora ainda não tenha conhecimento disso, iluminou de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos e conquistar um futuro melhor para ele.

A minha mãe Ana, tão batalhadora que não deixou de acreditar em mim, sempre me incentivando e ajudando, também ao meu pai Antônio (in memoriam) que foi o alicerce dos meus estudos.

Aos meus irmãos e minha irmã que também contribuíram com a realização deste projeto.

À querida professora Elizabeth W. O. Scheffer pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão, obrigada pela oportunidade de ser sua orientanda, pelos seus ensinamentos e principalmente por acreditar em mim, que Deus lhe conceda muita saúde e lhe retribua por tudo isso de maneira grandiosa. Muito obrigada mesmo!

Ao professor Dr. Ciro Zimmermann pelo apoio nas coletas e análises físico-químicas.

Aos professores, Eduardo S. Chaves e Cesar Arthur Martins Chornobai pela parceria institucional da UTFPR.

Aos colegas de laboratório do L-13, da UEPG, em especial a Karine Costa, Egon Castro e Thiago Rozada pelo apoio nas coletas e análises.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da UEPG, pela oportunidade.

Aos membros das minhas bancas de qualificação e de defesa, professores Patrícia Los Weinert, Vanessa Egéa dos Anjos e César Arthur Martins Chornobai que contribuíram com suas avaliações para a finalização deste trabalho.

A SANEPAR pela parceria técnica.

Ao Instituto Federal de Rondônia por tornar realidade este trabalho através de minha liberação para capacitação.

RESUMO

A cafeína é sugerida como indicador químico para a presença de águas residuais domésticas em sistemas de água doce, embora não esteja incluída em programas de monitoramento da qualidade. Assim, pode ser um excelente indicador de resíduos orgânicos contaminantes em córregos urbanos frequentemente afetados por esgoto no Brasil. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade da utilização da cafeína como indicador de contaminação por esgoto doméstico em águas superficiais da bacia do Rio Pitangui, no município de Ponta Grossa, Paraná (Brasil). No estudo, após a validação da metodologia analítica, buscou-se uma relação entre a cafeína em águas superficiais e o aporte de efluente. Foram realizadas 8 (oito) coletas de águas superficiais no Rio Verde, sendo em área urbana (P1), a montante (P2) e a jusante (P3) da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), além de duas coletas de efluente tratado da ETE. Para a determinação da cafeína foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), após extração em fase sólida em cartuchos C18/18 com volume extrator de 6ml. As avaliações físico-químicas das amostras superficiais mostraram um declínio da qualidade da água após o aporte do efluente tratado da ETE, observado principalmente através das concentrações de fósforo total (PT) e dos níveis da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) acima dos limites estabelecidos pela legislação, após o aporte do efluente. A cafeína foi quantificada nos pontos P2 e P3, com concentrações médias de 121,0 e 144,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados demonstraram a relação entre a presença da cafeína e a impactação pelo aporte de esgoto bruto, ou pelo efluente tratado da ETE.

Palavras-chaves: cafeína, águas superficiais, efluente, CLAE

ABSTRACT

Caffeine is suggested as a chemical indicator for the presence of domestic wastewater in freshwater systems, although it is not included in quality monitoring programs. Thus, it can be an excellent indicator of contaminant organic residues in urban streams frequently affected by sewage in Brazil. In this sense, the objective of this study was to evaluate the potential of caffeine as an indicator of domestic sewage contamination in surface waters of the Pitangui River Basin, in the city of Ponta Grossa, Paraná, Brazil. In the study, after the validation of the analytical methodology, a relationship was sought between caffeine in surface water and the effluent supply. Eight (8) surface water samples were collected in the Verde River, in the urban area (P1), upstream (P2) and downstream (P3) of the Sewage Treatment Station (STS), and two treated effluent samples of the STS. For the determination of caffeine, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used after solid phase extraction in C18/18 cartridges with extractor volume of 6ml. The physical-chemical evaluations of the surface samples showed a decline in the water quality after the STS treated effluent input, observed mainly through the concentrations of total phosphorus (PT) and Biochemical Oxygen Demand (BOD) levels, above the established limits by legislation, after the effluent. Caffeine was quantified at points P2 and P3, with mean concentrations of 121,0 e 144,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The results showed the relationship between the presence of caffeine and impaction by the inflow of raw sewage, or by the treated effluent from the STS.

Key-words: caffeine, surface water, wastewater, HPLC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da estrutura química da Cafeína	20
Figura 2	Representação esquemática das possíveis vias de transporte de cafeína no ambiente.....	23
Figura 3	Faixa média de concentração de cafeína encontrada na água das capitais brasileiras estudadas e as instituições responsáveis pelas coletas.	27
Figura 4	Esquema de representação do funcionamento do equipamento empregado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	30
Figura 5	Etapas de EFS no modo de concentração ou isolamento de analitos de interesse.	35
Figura 6	Bacia hidrográfica do Pitangui.	43
Figura 7	Localização do Ponto de coleta P1.	45
Figura 8	Localização dos Pontos de coleta P2 e P3	45
Figura 9	Ponto de coleta P1, Rio Verde em área urbana	46
Figura 10	Ponto de coleta P2, a montante da ETE Rio Verde	46
Figura 11	Ponto de coleta P3, a jusante da ETE Rio Verde	47
Figura 12	Curva Analítica para a cafeína em comprimento de onda de 273 nm	56
Figura 13	Cromatogramas obtidos na análise de cafeína em diferentes concentrações. Verificação do tempo de retenção, com Água/MetOH 78:22 em 273 nm	57
Figura 14	Cromatograma de padrão de cafeína 20,0 mg L ⁻¹	57
Figura 15	Cromatograma de amostra de efluente tratado de ETE	58
Figura 16	Cromatograma obtido para solução padrão de cafeína com concentração conhecida: 2 mg L	61
Figura 17	Cromatograma obtido para amostra de água superficial.	62
Figura 18	Curva analítica para determinação do Fósforo Total obtida em 660 nm	64
Figura 19	Gráfico comparativo entre os valores de DBO obtidos para os três pontos de amostragem durante o período de 8 coletas.	67
Figura 20	Valores médios de condutividade, alcalinidade total e cloreto dissolvido obtidos durante as 8 coletas realizadas	71
Figura 21	Relação entre PT e COD, nos pontos amostrais	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores obtidos através da CLAE para a construção da curva analítica	55
TABELA 2	Ensaio Analítico para avaliação da exatidão da técnica.	58
TABELA 3	Desvio Padrão para os ensaios de repetibilidade na faixa de concentração de 0,1 a 2,0 mg L ⁻¹	59
TABELA 4	Valores de Desvio Padrão Relativo (DPR)	60
TABELA 5	Precisão intermediária na faixa de concentração de 0,1 a 2,0 mg L ⁻¹	61
TABELA 6	Ensaio de recuperação da cafeína em amostras de águas superficiais.	63
TABELA 7	Ensaio para validação cartucho C18/18.	64
TABELA 8	Concentração de OD e Temperatura da água para os pontos amostrais nas 8 coletas realizadas	65
TABELA 9	Concentrações de DQO obtidos para os três pontos de amostragem durante o período de 8 coletas.	68
TABELA 10	Concentração de COD para os pontos amostrais	69
TABELA 11	Níveis de condutividade nos três pontos amostrais	70
TABELA 12	Concentrações de Fósforo Total obtidas em 8 coletas	73
TABELA 13	Concentrações de cafeína (µg L ⁻¹) nos pontos P2 e P3	75
TABELA 14	Concentração da cafeína no efluente tratado	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	Graus Celsius
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DBO	Demanda Bioquímica de oxigênio
DP	Desvio padrão
DPa	Desvio padrão do intercepto
DPM	Desvio padrão médio
DPR	Desvio padrão relativo
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de massas
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FC	Fator de correção
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	Fósforo Total
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IR	Índice de recuperação
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

MtOH	Metanol
OD	Oxigênio Dissolvido
SANEPAR	Companhia de Saneamento do Paraná
SURF	Surfactantes
T	Temperatura
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USGS	<i>United States Geological Survey</i>
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Ultravioleta

Não se deve ir atrás de objetivos fáceis.
É preciso buscar o que só pode ser
alcançado por meio dos maiores
esforços”.

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	15
2.	Revisão Bibliográfica.....	16
2.1	Contaminantes de preocupação emergente.....	18
2.2	Cafeína.....	20
2.3	Determinação de cafeína em amostras ambientais.....	28
2.4	O emprego da CLAE como técnica analítica para determinação da cafeína em amostras de águas superficiais.....	29
2.5	Extração e concentração do analito	33
2.6	Validação da metodologia.....	36
2.6.1	Linearidade.....	37
2.6.2	Exatidão.....	38
2.6.3	Precisão.....	39
2.6.4	Especificidade e seletividade.....	40
2.6.5	Limite de detecção (LD).....	41
2.6.6	Limite de quantificação (LQ).....	42
2.7	Taxa de recuperação.....	43
3.	Local de Estudo.....	43
4	OBJETIVOS.....	47
4.1	Objetivo Geral.....	47
4.2	Objetivos Específicos.....	47
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.1	Reagentes e solventes.....	48
5.2	Equipamentos.....	48
6	Metodologia.....	49
6.1	Preparação dos Materiais para Coleta e Análise.....	49
6.2	Procedimento de coleta.....	49

6.3	Analises <i>in situ</i> das amostras de águas superficiais da Bacia do Rio Pitangui.....	50
6.4	Análises de parâmetros físico-químicos em laboratório.....	50
6.4.1	Cloreto dissolvido.....	51
6.4.2	Alcalinidade total.....	52
6.4.3	Fósforo Total (PT).....	52
6.4.4	Carbono Orgânico Dissolvido.....	53
7	Pontos amostrais das coletas.....	53
8	Determinação da cafeína.....	53
8.1	Otimização da metodologia para análise da cafeína por CLAE....	53
8.2	Calibração.....	54
8.3	Condições cromatográficas.....	54
8.4	Extração em fase sólida (EFS ou SPE)	54
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
9.1	Validação analítica.....	55
10	Validação do Cartucho.....	63
11	Curva Analítica para Fosfato.....	64
12	Caracterização físico-química dos pontos amostrais em estudo.....	64
12.1	Oxigênio Dissolvido (OD) e Temperatura (°C).....	65
12.2	Matéria Orgânica.....	67
12.3	Condutividade, Alcalinidade total e Cloreto dissolvido e como indicativos de atividade antropogênica.....	70
12.4	Fósforo Total	72
13	Determinação da cafeína nos pontos amostrais.....	75
13.1	Análise do Efluente da ETE.....	76

14	Considerações Finais.....	78
15	Referências	80

1. INTRODUÇÃO

A contaminação das águas, tanto superficiais quanto subterrâneas, não é apenas um problema ambiental, mas também social, visto que é compartilhado por todos. Nesse sentido, é imprescindível que haja a compreensão de que o desenvolvimento humano deve estar associado à sustentabilidade, para que as necessidades presentes não comprometam as gerações futuras. Alterações dos recursos hídricos causadas pelo aporte de esgotos domésticos e industriais, tratados ou não, evidenciam-se cada vez mais como temas geradores de preocupações e de estudos ambientais. (TUBBS *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2006, MELO, *et al.*, 2009, POMA *et al.*, 2016).

O desenvolvimento urbano de Ponta Grossa, assim como na maioria dos municípios brasileiros, é acompanhado pelo adensamento populacional desordenado, fato que traz consequências diretas à qualidade dos mananciais. Assim, as circunstâncias que acarretam a perda da qualidade dos recursos hídricos, principalmente do Rio Pitangui, principal fonte de abastecimento da cidade, tais como o despejo em suas águas de esgoto sanitário tratado ou não, contendo os mais variados tipos de poluentes e, as consequências dessa impactação, compõem um cenário para investigações (FONSECA, 2014; RIBICKI, 2013).

Entre os tipos de contaminantes, tem merecido destaque os chamados contaminantes de preocupação emergente, substâncias assim chamadas pelo fato de suas concentrações no ambiente ainda não terem sido regulamentadas, e que anteriormente não eram detectados, e não eram considerados como um risco, ou capazes de causar efeitos adversos à saúde (SODRÉ *et al.*, 2010; FONSECA, 2014).

A identificação desses compostos no meio ambiente se tornou possível através da evolução de equipamentos, amostragem, técnicas de extração e análises, pois estão presentes em concentrações de difícil detecção, na faixa de ng L⁻¹. Uma alternativa para apontar sua presença, ainda que, de maneira indireta, são os chamados indicadores de atividades antrópicas. Tais indicadores podem ser, por exemplo, substâncias detectadas com maior eficiência e, que devido a sua natureza antrópica, podem confirmar a entrada de águas residuárias domésticas nos ambientes e assim, de forma indireta alertar para a presença dos contaminantes emergentes (GARDINALI & ZHAO, 2002; FERREIRA, 2005; PELLER *et al.*, 2006).

A cafeína é um exemplo de indicador de contaminação por esgoto, pois pode ser mais facilmente detectada na água, como consequência da sua alta solubilidade ($13,5 \text{ g L}^{-1}$), baixo coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}=0,01$) (GOSSETT et al., 1983) e volatilidade insignificante, constituindo um marcador, diretamente relacionado a atividades humanas (GARDINALI & ZHAO, 2002).

Ela está entre as substâncias mais consumidas no mundo e, por semelhança de origem, sua presença em águas superficiais sinaliza a existência de outros contaminantes, considerada assim um marcador químico que pode indicar a presença de esgoto sanitário nos mananciais. (ARIAS, 2013, BUERGE *et al.*, 2003; SEIGENER; CHEN, 2002, SEILER *et al.*, 1999. BUERGE *et al.*, 2006).

Diante do exposto, revela-se a importância em avaliar a presença da cafeína, e implantar metodologias analíticas visando à quantificação em amostras ambientais. Esse estudo deve vir acompanhado do levantamento das características do ambiente aquático estudado, principalmente através de parâmetros físico-químicos visando discutir planos de preservação e gestão ambiental.

2. Revisão Bibliográfica

O espaço em que vivemos – o Planeta Terra, sofre inúmeras modificações com o crescimento da população, condições que podem ocasionar um descontrole ambiental. Ao longo dos séculos, foi gerado um ciclo de degradação ambiental que a cada dia se torna mais intenso. Assim, por exemplo, a necessidade de aumentar a quantidade de alimentos produzidos, veio acompanhada da ampliação de áreas produtivas, com conseqüente desmatamento. Some-se a isso, a geração de resíduos e a ocupação desordenada das áreas urbanas trazendo alterações drásticas, que afetam diretamente não apenas os seres humanos, precursores deste ciclo, mas toda a vida em nosso planeta. As situações de modificação do clima, com verões mais quentes, com chuvas intensas e tempestades, o derretimento das geleiras, e a crescente escassez da oferta de água, podem ser decorrentes da degradação ambiental, e produtos de todo este ciclo (BANNAGA, 2016; TUNDISI, 2008; MANIGLIA, 2011).

A intensificação dos processos de urbanização tem gerado inevitáveis alterações aos ambientes naturais e impactos aos corpos hídricos. A perda da qualidade dos recursos hídricos é ocasionada principalmente pela entrada de matéria orgânica, rica em nutrientes, e que é originada em áreas urbanas pelo lançamento irregular de esgotos domésticos sem tratamento, ou de efluentes resultantes do tratamento ineficiente do esgoto; e na área rural, pela drenagem de áreas de agricultura e pecuária. No entanto, mais preocupante ainda é reconhecer que o tratamento da água que é distribuída à população, não elimina numerosos poluentes orgânicos, metais potencialmente tóxicos, entre outros, que permanecem ainda que em níveis traço (CASTRO, 2015).

As águas superficiais doces são fonte principal de água potável aos seres humanos, mas também o habitat de inúmeros organismos de origem animal e vegetal, além de oferecer a possibilidade de recreação, atuar como reguladora da temperatura, como diluidora e transportadora de nutrientes e resíduos. Assim, articular a relevância dos conhecimentos sobre a água, em suas diversas dimensões, é pensar na sobrevivência da espécie humana, na conservação e no equilíbrio da biodiversidade e nas relações de dependência entre seres vivos e ambientes naturais. (BACCI e PATACA 2008; BAIRD, 2002).

A Resolução nº 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre a classificação da água doce em cinco classes: a especial, a classe 1, a classe 2, a classe 3 e a classe 4, relacionadas a parâmetros físico-químicos e limites aceitáveis, considerando os diferentes usos e a sua destinação final.

É sabido que as águas superficiais recebem, através de fontes pontuais ou difusas, inúmeras substâncias sem que se tenha conhecimento do seu impacto ambiental. Neste sentido, anos podem se passar até que efeitos indesejáveis sejam observados, e mais tempo ainda para que ações preventivas e/ou remediativas sejam adotadas. É impraticável considerar que as legislações abordem todas as substâncias que possam trazer algum risco à saúde, tendo em vista que a produção e lançamento destas substâncias são muito maiores do que o esclarecimento dos seus efeitos danosos por meio de avaliações toxicológicas (CANELA *et al.*, 2014).

A degradação da qualidade ambiental é definida na Política Nacional do Meio Ambiente, Lei nº. 6.938/81, como a poluição que pode ser proveniente de atividades diretas e indiretas, e que afetem a saúde, a segurança, o bem-estar da população ou

que criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; comprometendo desfavoravelmente a biota, e as qualidades aparentes ou sanitárias do meio ambiente; ou dispondo matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais. Assim, a degradação ambiental poderá ter origem a partir dos poluentes, definidos como toda e qualquer forma de matéria ou energia que, direta ou indiretamente, causa impacto ao meio ambiente (BRASIL, 1981).

A restrição da qualidade da água bruta põe em risco as possibilidades futuras de abastecimento, e neste sentido, a extensão e a intensidade que cada atividade antrópica pode interferir na qualidade das águas deve ser avaliada.

2.1 Contaminantes de Preocupação Emergente

Os recursos hídricos são impactados diariamente por diversos contaminantes, muitos destes resultantes da forma de viver da sociedade moderna orientada por uma crescente disposição ao consumo de bens ou serviços, que prioriza a ampla utilização e descarte. Os poluentes chamados emergentes, via de regra, estão associados a esse consumismo, mas ainda não recebem nenhum controle no ambiente e não estão inseridos em programas de monitoramento oficial, porém seus efeitos adversos ecológicos e/ou sobre a saúde humana estão sob suspeita (SILVA *et al.*, 2016; FONSECA, 2014; SILVA E COLLINS, 2011; CANELA *et al.*, 2014).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) sugere que os contaminantes de preocupação emergente podem ser poluentes bióticos e/ ou abióticos, e são candidatos a fazer parte de legislações futuras dependendo de pesquisas sobre ecotoxicidade, efeitos sobre a saúde e dados sobre sua ocorrência em vários compartimentos ambientais (EPA, 2015). Ainda, conforme a agência Norte-Americana, a USGS (do inglês, *United States Geological Survey*), um contaminante emergente pode ser definido, como uma substância química, de ocorrência natural ou antrópica, ou qualquer micro-organismo que não é normalmente controlado no ambiente, mas que tem potencial para entrar no ambiente e causar efeitos adversos ecológicos e/ou sobre a saúde humana, sendo estes efeitos conhecidos ou suspeitos.

Assim, a denominação emergente não está relacionada à descoberta recente, e sim ao fato de representar um grupo ambientalmente importante em razão dos usos

e níveis crescentes de utilização e de contaminação. Estão associados a substâncias presentes numa variedade de produtos comerciais como: fármacos, hormônios e esteroides, produtos de higiene pessoal, antibióticos, bronzeadores, anti-inflamatórios, analgésicos, antissépticos repelentes, fragrâncias, anticorrosivos, produtos de limpeza, aditivos de gasolina, pesticidas, e mais recentemente foram incluídas as nanopartículas (CORREIA, 2008; GHISELLI, 2006; REIS FILHO *et al.*, 2007; CANELA *et al.*, 2014; MATAMOROS *et al.*, 2012; ROCHA, JÚNIOR, 2014).

Alguns contaminantes emergentes são suspeitos de ter o potencial para perturbar o sistema endócrino e reprodutivo dos animais, inclusive dos humanos, podendo ocasionar abortos espontâneos, distúrbios metabólicos e incidência de neoplasias malignas, além da indução de bactérias mais resistentes tendo demonstrado ação desreguladora endócrina, persistente e bioacumulativa. (BARBIER *et al.*, 2013, CANELA *et al.*, 2014).

Reis Filho (2007), destaca que os esforços em pesquisas com investigação dos contaminantes emergentes são enormes e que instituições como USEPA, citam desde 2012, inúmeras substâncias emergentes que deveriam ser analisadas em águas superficiais, especialmente aquelas águas consideradas impactadas a partir da determinação de parâmetros microbiológicos ou físico-químicos.

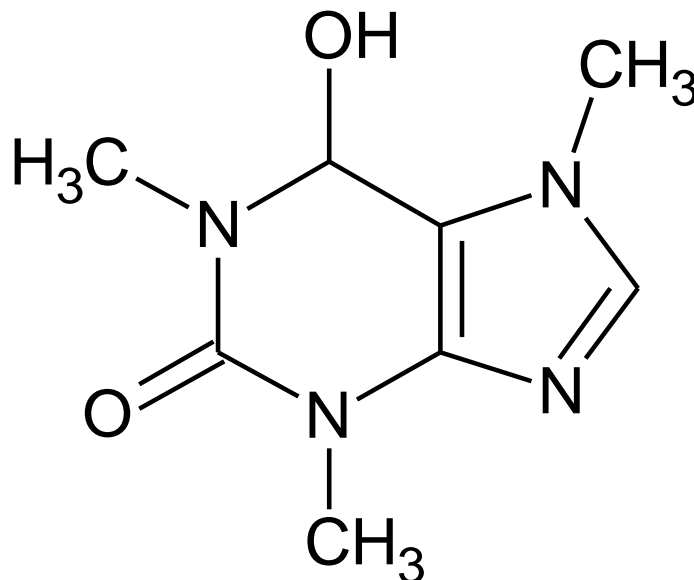
Essa relação entre parâmetros tradicionalmente indicadores de impacto em águas superficiais e a presença de poluentes emergentes, trouxe uma nova abordagem que considera algumas dessas substâncias emergentes como indicadores de atividades antrópicas (PASQUINI, 2016; DANESHVAR *et al.*, 2012).

Neste trabalho, a substância cafeína, considerada um marcador (ou indicador) de impactação aquática, foi estudada juntamente com outros parâmetros tradicionais, buscando-se uma relação entre a presença dessa substância e o aporte de esgoto bruto e/ou de efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE). A abordagem considera a hipótese que o esgoto tratado, lançado como efluente nos corpos aquáticos, também é fonte de cafeína e conseqüentemente de poluentes emergentes, mesmo após o tratamento convencional.

CAFEÍNA

A cafeína é um composto químico amplamente consumido mundialmente, pertence ao grupo de compostos lipídicos solúveis denominados de purinas, quimicamente conhecida como 1,3,7, trimetilxantina (FIGURA 1). É classificada como alcaloide e pode ser encontrada naturalmente associada a outros dois compostos do mesmo grupo: a teofilina e a teobromina, diferenciadas pela posição do grupo metil (GONÇALVES, 2008; GNOATTO, 2007; HIGDON e FREI, 2006).

Figura 1: Representação da estrutura química da Cafeína



Fonte: Adaptado de Gnoatto (2007)

É considerada, juntamente com as anfetaminas e a cocaína, uma droga estimulante psicomotora, possuindo um efeito acentuado sobre a função mental e comportamental que produz excitação e euforia, redução da sensação de fadiga e aumento da atividade motora, considerando diferentes níveis de concentração. É encontrada naturalmente em grãos de café, em chás, chocolates, grãos de cacau, e nozes da planta cola que está presente em refrigerantes a base de cola. Em torno de 95% da cafeína ingerida é metabolizada pelo fígado, e só cerca de 3% a 5% é recuperada na sua forma original na urina (BASSIT, 2016; RETNADHAS e GUMMADI, 2014; PARAG *et al.*, 2012; CANELA *et al.*, 2014; HECKMAN *et al.*, 2010).

O teor de cafeína no café varia com diferentes fatores, como o tipo e grau de maturação do grão, grau de moagem e torra, preparo da bebida e outros. No entanto, em média, uma xícara de 240 mL de café contém 100 mg da substância. Cafés expressos são os que oferecem os maiores teores de cafeína alternando entre 240 e 720 mg por xícara. Uma xícara de chá-mate apresenta maior teor de cafeína (78 mg) quando comparada a uma de chá-preto (55 mg) e a uma de chá-verde (35 mg) (HECKMAN *et al.*, 2010, CANELA, *et al.*, 2014).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de acordo com uma estimativa baseada em dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares de 2008-2009, revelou um consumo brasileiro diário de cafeína de pouco mais de 115 mg por pessoa, sendo a maior ingestão média de cafeína da Região Sul (SARTORI; SILVA, 2013).

O consumo de cafeína tem aumentado em todo mundo, pesquisas demonstram que os efeitos da cafeína no organismo humano variam de indivíduo para indivíduo, dependendo da concentração, da frequência de consumo, da massa corpórea, do metabolismo e da sensibilidade individual (ABIC, 2015). Segundo Lima (2007), o consumo em quantidades moderadas, em média até quatro xícaras por dia, 300mg/dia, tem a capacidade de melhorar o estado de alerta e ajuda na concentração, torna o cérebro mais atento e capaz de suas atividades intelectuais, suaviza a incidência de apatia e depressão e estimula a memória, atenção, e, portanto, melhora o humor, podendo ser consumido por todas as idades, inclusive crianças e adolescentes (NANJUNDAIAH *et al.*, 2016).

De acordo com Heckman e colaboradores (2010), em contrapartida, também podem ocorrer efeitos negativos, como alterações no sono, dores de cabeça, problemas cardíacos, ansiedade, náusea, entre outros. Existem inclusive grupos considerados de risco com relação ao consumo desta substância, tais como as gestantes e aquelas em período de amamentação, podendo provocar efeitos adversos ao recém-nascido, além de, anteriormente, provocar redução no ganho de massa corpórea do feto e contribuir para o aborto espontâneo.

A Agência Reguladora de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) pondera como seguro um consumo de cafeína de até 400 mg/dia para adultos. A Agência de Saúde do Canadá sugere 450 mg/dia para adultos, 300 mg para gestantes e 85 mg para adolescentes. O estudo realizado pelo *Institute of Food Technologists*, abordado por Heckman e colaboradores (2010), descreve o consumo

diário da cafeína por adultos em mg/dia em alguns países (QUADRO 1). Observe-se que o Brasil, o maior produtor mundial de café, também se destaca no consumo da cafeína, sendo, de acordo com os valores obtidos, o terceiro maior consumidor.

Quadro 1: Estimativa do consumo de cafeína em média por dia

País	Adultos (mg/dia)
China	16
África do Sul	40
Kênia	50
Estados Unidos	168
Japão	169
Canadá	210
Austrália	232
França	239
Brasil	300
Finlândia	329
Dinamarca	390

Fonte: HECKMAN *et al.*, 2010.

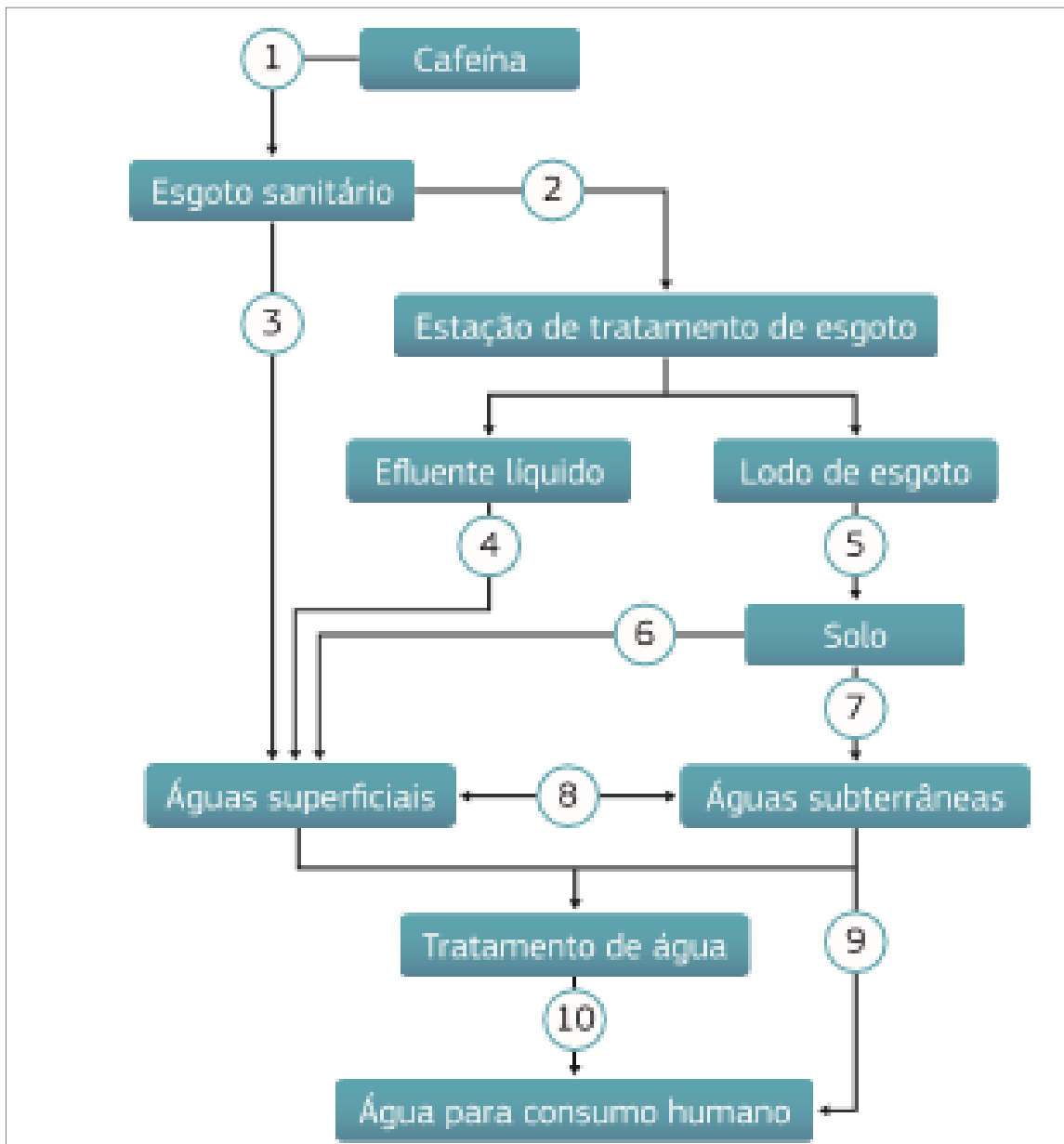
Após a ingestão, a cafeína é rapidamente absorvida e metabolizada, atingindo um pico na corrente sanguínea em 1 a 2 horas, e sua excreção pode ocorrer em até 48 horas, especialmente pela urina. Cerca de 1 a 5% da cafeína não é metabolizada pelo indivíduo os quais aparecem em concentrações significativas no esgoto bruto (CANELA *et al.*, 2014).

A cafeína é metabolizada no fígado por desmetilação e oxidação na posição 8, pela remoção dos grupos metila 1 e 7, cuja reação será catalizada pelo citocromo P450, formando três grupamentos metilxantina. A maior parte dessa metabolização (84%) se processa na forma de paraxantina (1,7-dimetilxantina), seguida de teofilina (1,3-dimetilxantina), e de teobromina (3,7-dimetilxantina) por meio da mudança na posição dos grupos metila 1,3 e 7 (MANDAL, 2016).

A cafeína, assim como os poluentes emergentes, tem como origem produtos utilizados no dia a dia, os quais apresentam, basicamente, a mesma rota e vias de transporte no ambiente, conforme mostrado na Figura 2. No esquema exibido, a Rota

① representa o esgoto bruto, o qual foi enriquecido com cafeína, através da urina ou com o descarte em ralos, pias e ou vasos, de produtos que contém em sua composição a cafeína, evidenciando sua atuação como indicador químico de esgoto doméstico.

Figura 2 Representação esquemática das possíveis vias de transporte de cafeína no ambiente



Fonte: Canela *et al.*, 2014.

As rotas ② e ③ representam, respectivamente, os serviços de esgotamento sanitário com e sem canalização do esgoto até estações de tratamento de esgoto (ETE), a terceira rota indica o serviço de afastamento do esgoto bruto da população que, invariavelmente, culmina com seu descarte em sistemas de águas superficiais, com o descarte irregular do esgoto, ou seja, aquele que não é realizado de maneira adequada pela concessionária responsável pelo serviço de esgotos. Após a entrada na ETE, a qual não é preparada para todos os tipos de contaminantes emergentes provenientes do esgoto, a cafeína pode ser encontrada tanto no efluente líquido como no lodo residual da ETE. A fração sólida pode ser utilizada para fertilização e condicionamento de solos agricultáveis, finalizando o processo a cafeína pode então surgir em águas naturais, por meio do escoamento superficial (rota ⑥) ou da lixiviação (rota ⑦). A rota ⑧, apontada na Figura 2, representa a interface existente entre os sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos. A água subterrânea pode ser bombeada e utilizada para fins de consumo (rota ⑨) ou submetida a tratamento. Por fim, a rota ⑩ representa a distribuição de água para consumo humano por meio de redes municipais de distribuição ou caminhões-pipa (CANELA *et al.*, 2014).

A cafeína foi identificada pela primeira vez em 1977 por Sievers e colaboradores (1977) nas águas residuais e em águas superficiais contaminadas por águas residuais domésticas em 1978, porém não houve a quantificação da cafeína apenas a determinação de sua presença. (SEILER *et al.*, 1999).

A concentração da cafeína foi determinada em diversos trabalhos pelo mundo todo (LOOS *et al.*, 2010; VYSTAVNA *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2013; MUSOLFF *et al.*, 2009; FOCAZIO *et al.*, 2008; LEUNG *et al.*, 2013; MATONGO, *et al.*, 2016) inclusive, no Brasil, tanto em águas superficiais como também nos efluentes dos esgotos (SEILER *et al.*, 1999; STRAUCH *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2016) e ainda em água marinhas (REY *et al.*, 2012). Nos primeiros estudos nesse sentido no Brasil, a cafeína foi encontrada no esgoto bruto do município de Campinas, SP, em níveis superiores a $290 \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, elevados se comparados com os de outros países, sendo considerada um marcador químico (SODRÉ *et al.*, 2010).

Portanto, a cafeína vem sendo descrita como um marcador ou indicador químico, ou seja, pertencendo ao grupo substâncias presentes exclusivamente no metabolismo humano ou resultantes da atividade humana, não havendo portanto, fontes naturais de produção (GONÇALVES, 2008) MACENO, 2015).

Bradley e colaboradores (2003) destacam as características de um indicador de contaminação por esgoto doméstico: ser detectável no ambiente em concentrações relevantes utilizando-se os métodos analíticos disponíveis, não ser totalmente removido durante o tratamento nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), ser utilizado pelo homem antes de entrar no sistema de esgoto, e comportar -se no ambiente de maneira significativa de outros importantes contaminantes derivados de efluentes domésticos. Segundo Gonsalves (2008) a cafeína se comporta como indicador de contaminação por esgoto doméstico, devido a essas características anteriormente citadas.

Assim, segundo Gardinali e Zhao (2002) seu uso como indicador de impactação por esgoto, é apropriado devido à persistência ao longo da coluna d'água, e, além disso, apresenta pouca associação com os sedimentos (TUBBS *et al.*, 2002). Como indicador de contaminação ambiental por esgoto doméstico, a cafeína tem sido relato de inúmeros trabalhos (SEILER *et al.*, 1999, FERREIRA, 2005, GONÇALVES, 2008, SIEGENER, CHEN, 2002, PEELER *et al.*, 2004, RODRIGUEZ DEL REY *et al.*, 2012).

Quadro 2: Concentrações (ng L⁻¹) de cafeína em mananciais de diferentes países.

Concentração máxima Faixa de concentração (ng L ⁻¹)	País	Referência
1.467,0	Itália	Loos <i>et al.</i> , 2010
0,6 – 1.056,0	Itália	Loos <i>et al.</i> , 2007
143,0	Alemanha	Musolff <i>et al.</i> , 2009
10,0 – 152,0	França	Vystavna <i>et al.</i> , 2012
13,0 – 107,0	França	Togola; Budzinski, 2008
675,0 – 13.167,0	Espanha	Valcarcel <i>et al.</i> , 2011
12,2 – 415,0	Espanha	Fernández <i>et al.</i> , 2010
2.991,0	Espanha	Huerta-Fontela <i>et al.</i> , 2007
21,4 – 20.427,0	Turquia	Aydin; Talinli, 2013
1,6 – 224,8	EUA	Wang <i>et al.</i> , 2011
14.270,0	EUA	Focazio <i>et al.</i> , 2008
781,0	Canadá	Daneshvar <i>et al.</i> , 2012
3,8 – 625,5	China	Zhu <i>et al.</i> , 2013
0,15 – 16,7	Brasil (São Carlos, SP)	Linden, <i>et al.</i> 2015

Quadro 2: Concentrações (ng L⁻¹) de cafeína em mananciais de diferentes países.

(continua)

174,0 – 127.092,0	Brasil (Campinas, SP)	Montagner; Jardim, 2011
1.410,0 – 753.500,0	Brasil (Curitiba, PR)	Frohener <i>et al.</i> , 2010
160,0 – 47.500,0	Brasil (Teresópolis, RJ)	Gonçalves, 2008

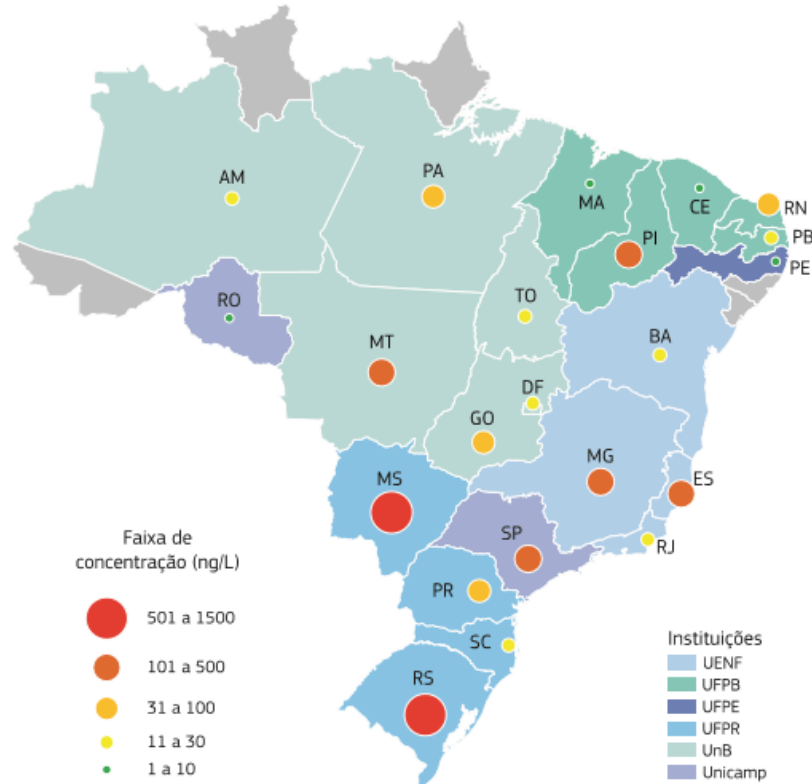
Fonte: Adaptado de Canela *et al.*, 2014.

Em águas superficiais continentais, as concentrações da cafeína podem ser alteradas em função da sazonalidade, proximidade das fontes de aporte, condições hidrológicas e padrão de consumo. O Quadro 2 apresenta a concentração de cafeína pertencente em mananciais de diferentes países.

Em 2005, pesquisadores da Fundação Osvaldo Cruz realizaram estudo evidenciando a cafeína como apontador da qualidade de águas, e na cidade de São Paulo a presença de cafeína foi detectada nas águas da represa Billings. (FERREIRA, 2005; CUNHA, 2005). No entanto, muitas outras evidências têm mostrado que a presença de cafeína em águas brasileiras está relacionada ao aporte dos efluentes de esgoto e de esgoto bruto, em ambientes aquáticos naturais (SODRÉ *et al.*, 2007; FROEHNER *et al.*, 2010; 2011; MONTAGNER; JARDIM, 2011; GOMES *et al.*, 2013).

Um estudo recente realizado no Brasil, por Canela e colaboradores (2014), através do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) em 2014, com colaboração de Instituições de Ensino Superior, determinou a faixa média de concentração da cafeína encontrada nas águas que foram coletadas diretamente dos cavaletes em algumas capitais brasileiras, conforme figura 3.

Figura 3: Faixa média de concentração de cafeína encontrada na água das capitais brasileiras estudadas e as instituições responsáveis pelas coletas.



Fonte: CANELA *et al.*, 2014.

Na pesquisa citada, a cafeína teve sua concentração determinada em 93% das amostras coletadas, as quais eram amostras de água para consumo humano, sendo que na capital Porto Alegre registrou-se a maior faixa de concentração, com um valor médio de 1.211 ng L⁻¹. Os valores mínimo e máximo determinados nas águas dessa capital foram 122 ng L⁻¹ e 2.769 ng L⁻¹, respectivamente (CANELA, *et al.*, 2014, MONTAGNER, 2014).

Assim, a cafeína tem sido sugerida como um indicador químico para a presença de águas residuais domésticas em sistemas de água doce, embora ela não esteja incluída em programas de monitoramento da qualidade da água. (SPENCE, 2015). Ferreira e colaboradores (2005) apontam ainda que a cafeína pode ser um excelente indicador para a presença de resíduos orgânicos contaminantes e patógenos em córregos urbanos frequentemente afetados por esgoto bruto no Brasil. Além disso, um estudo recente realizado por Montagner e colaboradores (2014) em São Paulo, sugere que a cafeína pode ser inclusive um indicador para a atividade estrogênica, ou seja, advertindo a presença de disruptores endócrinos.

2.2 Determinação de cafeína em amostras ambientais

As matrizes ambientais constituem-se em amostras complexas, tais como águas naturais, efluentes industriais, solos, sedimentos, emissões gasosas, entre outros, que apresentam analitos como as substâncias de preocupação emergente, em concentrações traço. Dessa forma, encontrar um método analítico confiável para efetuar análises dessas amostras é um dos grandes desafios na pesquisa de micro poluentes, pois, além da complexidade da matriz, os analitos estão presentes em concentrações na ordem de picograma (10^{-12} g) a miligrama (10^{-3} g) por litro de amostra (AQUINO, *et al*, 2013, LEPOM, 2009).

Matrizes ambientais complexas, concentração em nível de traços e a presença de novos contaminantes, trouxeram a necessidade do avanço na instrumentação e desenvolvimento de metodologias mais rápidas, precisas, sensíveis e exatas para tornar possível a determinação e quantificação destas substâncias nas amostras ambientais (BARCELÓ, 2012, BRAVO, 2012).

Segundo Cardoso (2011), para determinação de compostos orgânicos em nível traço em matrizes ambientais, as etapas básicas são: extração, pré-concentração do analito, eliminação de interferentes, separação, detecção e quantificação.

Para matrizes ambientais entre as técnicas mais utilizadas para determinação e quantificação de micro poluentes, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), porém o custo elevado para aquisição de equipamentos e manutenção são alguns fatores limitantes para o uso rotineiro.

Nanjundaiah e colaboradores (2016), indicam que, para a detecção de cafeína estão disponíveis inúmeros métodos analíticos além de CLAE e CG, tais como métodos espectroscópicos e colorimétricos, métodos eletroquímicos, métodos voltamétricos como a voltametria de pulso diferencial, e análise de fluxo de injeção (FIA) com múltiplos pulsos e detecção amperométrica FIA – FTIR. No entanto, esses métodos apresentam algumas desvantagens como o tempo longo para análise, a formação de incrustações nos eletrodos, a alta reatividade cruzada, a baixa sensibilidade, entre outros.

Também Maria e Moreira (2007), enumeram vários métodos e técnicas para a detecção e quantificação da cafeína como por exemplo: Gravimetria e determinação

de nitrogênio, Eletroforese capilar, Espectroscopia de infravermelho e diversas técnicas cromatográficas: Cromatografias de adsorção e camada delgada, Cromatografia gasosa (CG), Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Cromatografia líquida de alta eficiência-EM com coluna de permeação em gel, etc.

Apesar do custo comparativamente mais elevado das análises cromatográficas, a CLAE tem sido amplamente empregada, devido à sua ampla aplicabilidade e notável precisão do ensaio, com separação rápida e alta resolução, utilizada para vários tipos de amostras relativas à indústria farmacêutica, alimentar, meio ambiente e também a análise diária em laboratórios de pesquisa (HAYES *et al.*, 2014, MOURA, 2015, ZHANG ET *al.*, 2016).

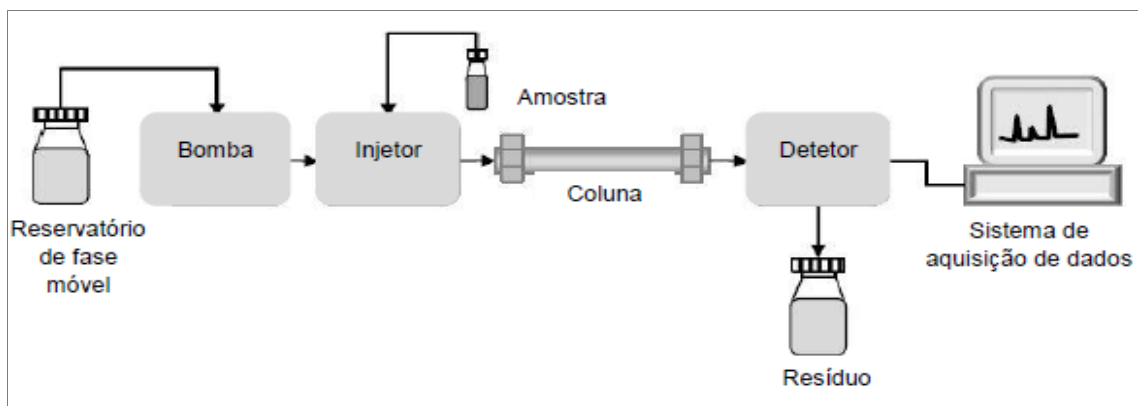
2.3O emprego da CLAE como técnica analítica para determinação da cafeína em amostras de águas superficiais

A cromatografia líquida tem como princípio a separação individual dos vários constituintes de uma mistura, seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. A técnica baseia-se na separação de substâncias por processo de transferência de massa entre uma fase móvel, composta por água e/ou solventes orgânicos, e uma fase estacionária, composta por uma coluna contendo um material que tenha afinidade com o analito. A eficiência, sensibilidade e rapidez são vantagens que a CLAE apresenta em relação às outras técnicas (SKOOG, 2002).

Desde o fim da década de 1970, o monitoramento dos micropoluentes no meio ambiente vem recebendo um grande interesse da comunidade científica, (HIGNITE & AZARNOFF, 1977; AHERNE; ENGLISH; MARKS,1985,) e com isto a cromatografia passou a ser um dos métodos analíticos amplamente utilizados, seja para fins quantitativos e/ou qualitativos. Crescimento este, relacionado à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, assim como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência. (TONHI *et al.*, 2002, AQUINO, *et al.*, 2013).

Os principais componentes do equipamento necessários para realização da cromatografia líquida são: a bomba, que movimenta a fase móvel e a amostra através de uma coluna; a coluna, que contém a fase estacionária, geralmente formada por partículas de sílica, porosas, esféricas e diâmetro em torno de 35 μm , e um detector que mostra os tempos de retenção das moléculas. (MALVIYA *et al.*, 2010), conforme o esquema abaixo (Figura 4).

Figura 4: Esquema de representação dos componentes do equipamento empregado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)



Fonte: CZAPLICKI, 2004

O tempo de retenção de um analito dentro de um sistema de cromatografia de alta eficiência, indica o tempo gasto por um componente desde a sua injeção na coluna até a sua detecção na saída do sistema. O tempo de retenção varia de acordo com as interações entre a fase estacionária, as moléculas da amostra a ser analisada, e o solvente utilizado. A amostra a ser analisada é introduzida em pequenas quantidades, e seu fluxo é retardado pelas interações com a fase estacionária. A amostra pode ser injetada, quando a fase móvel está ou não em fluxo. Assim, o tempo de retenção é o período gasto por um componente desde a sua injeção até a sua detecção na saída do sistema, envolvendo todo o período que o componente fica no sistema cromatográfico, seja diluído na fase móvel, seja retido na fase estacionária (MALVIYA, 2010).

O solvente deve ter características necessárias para ser utilizado como fase móvel na CLAE, sendo os mais utilizados: água, metanol e acetonitrila. A fase móvel deve dissolver a amostra sem qualquer interação química entre ambas, deve

apresentar alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possa realizar análises de alta sensibilidade. As impurezas podem interferir na detecção do analito, principalmente com detector por ultravioleta (UV). É indispensável à compatibilidade entre o detector e a fase móvel, além de apresentar polaridade adequada, permitindo a separação conveniente dos constituintes da amostra (SKOOG, 2006).

Como fase estacionária utilizam-se sólidos ou semirrígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar. A coluna cromatográfica é feita de material inerte que resiste a todas as pressões a que pode ser submetida, geralmente são tubos de aço inoxidável. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio, sendo que as microcolunas apresentam vantagens relacionadas à velocidade e consumo mínimo de solventes, o que tem importância significativa, pois os solventes de altíssima pureza necessários cromatografia são caros, tanto para serem adquiridos quanto para serem descartados. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina) (SKOOG, 2006; HARRIS, 2001, TONHI *et al.*, 2002).

Os recheios preparados a partir de partículas de sílica são mais comumente usados para cromatografias líquidas. As partículas de sílica são sintetizadas, aglomeradas e formam um material de dimensões maiores e uniformes, que são revestidos por filmes orgânicos, os quais são quimicamente ou fisicamente ligados à superfície da coluna utilizada (SKOOG, 2006). Além de que, a sílica apresenta característica de ser mecanicamente estável às altas pressões, facilmente modificada e existe um amplo conhecimento de sua estrutura e suas propriedades. Outro exemplo de fase estacionária são as com suportes de celulose ou polímeros de estireno-divinilbenzeno, mas estas fases proporcionam problemas de baixa resistência às altas pressões empregadas em CLAE. E ainda, os óxidos inorgânicos como alumina, titânia e zircônia, também são fases estacionárias utilizadas em CLAE em fase reversa. (TONHI *et al.*, 2002).

O detector cromatográfico é um dispositivo conectado logo após a coluna cromatográfica, sensível ao contato com o analito presente no eluente, emitindo sinais elétricos que são transformados graficamente em formas de pico. Através deste registro, podem-se obter dados qualitativos e quantitativos sobre os analitos presentes na amostra.

Os detectores mais usados na CLAE são os fotométricos, baseados na absorção do ultravioleta e no visível, entretanto o detector de arranjo de diodos é, dentre os detectores, o de menor custo além de ser o detector mais utilizado em determinações analíticas de poluentes ambientais (DEGANI, CASS E VIEIRA, 1998).

Entretanto, não existe apenas um deles que apresente todas as propriedades e que seja ideal para CLAE. Um detector ideal para a CLAE seria aquele com as seguintes características: alta sensibilidade, baixo limite de detecção, resposta rápida a todos os analitos, insensibilidade a mudanças na temperatura e na vazão da fase móvel, resposta independente da fase móvel, pequena contribuição ao alargamento do pico pelo volume extra da cela do detector, resposta que aumente linearmente com a quantidade do soluto, não destruição do soluto, segurança e conveniência de uso, informação qualitativa do pico desejado. Assim, o detector ideal é aquele adequado ao seu sistema cromatográfico, à fase móvel (eluente) utilizada e principalmente às propriedades dos analitos alvo presentes na análise (SKOOG, 2002; SKOOG *et al.*, 2006, TONHI *et al.*, 2002).

O emprego da CLAE-UV para determinação de cafeína apresentou um importante salto qualitativo, no que diz respeito aos parâmetros de precisão, exatidão e rapidez na análise. Entretanto, a principal desvantagem da CLAE-UV é a necessidade de uma preparação intensiva da amostra, a qual é essencial para se eliminar interferentes nas matrizes, particularmente nos fluídos biológicos, que co-eluem com a cafeína e, também, absorvem na mesma faixa de comprimento de onda (MARIA e MOREIRA, 2007).

O uso da técnica CLAE, para determinação e identificação da cafeína tem sido verificado em trabalhos que envolvem matrizes ambientais como as amostras coletadas em estações de tratamento de água (CANELA *et al.*, 2014) e de esgoto (PAXÉUS; SCHRÖDER, 1996, GHISELLI, 2006), e no esgoto bruto, (SODRÉ *et al.*, 2010), assim como para análises biológicas no soro humano (SEILER *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2016) e na área de alimentos como nos estudos sobre o chá verde (SAITO *et al.*, 2006, LOPES, *et al.*, 2007), entre outras temáticas.

Recentemente Matongo e colaboradores (2015), realizaram a identificação e quantificação de produtos farmacêuticos, incluindo a cafeína, em amostras de sedimentos, águas residuais e águas superficiais, coletadas em países africanos,

empregando a técnica CLAE associada a espectrômetro de massa para determinação dos analitos.

Além da escolha da técnica, a etapa essencial de uma análise quantitativa é a seleção do método, na qual deve-se levar em consideração o nível de exatidão requerido, e fatores como o tempo de realização das análises e custo. A complexidade e o número de componentes presentes da amostra sempre influenciam, de certa forma, na escolha do método. Para ZHANG e colaboradores (2016) para minimizar estas circunstâncias a remoção do efeito de matriz e o pré-tratamento da amostra são de grande importância. Além disso, a seleção de itens tais como o tipo de coluna, a composição da fase móvel e o tipo de detector apropriado são preponderantes para um bom resultado (BRAVO, 2012).

2.4 Extração e concentração do analito

A análise cromatográfica de amostras ambientais requer, em geral, pré-tratamento e extração em fase sólida, pois são matrizes complexas, e apresentam concentração de analito em nível de traço. A obtenção de uma fração da amostra original enriquecida com o componente de interesse pode ser obtida pelas técnicas de extração (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Em meio às técnicas de extração normalmente utilizadas para concentrar analitos, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), a extração com fluido supercrítico (SFE), a extração em fase sólida (EFS) e, mais recentemente, a micro extração em fase sólida (SPME) (BARRIONUEVO e LANÇAS, 2001, ZHANG *et al.*, 2016).

Técnicas de microextração em fase sólida ou micro-EFS (SPME – *solid phase microextraction*) são de extração rápida e livre de solventes, tem sido amplamente utilizada para a extração de compostos orgânicos, entretanto, também apresentam potenciais problemas como o alto custo, o efeito memória se houver a reutilização das fibras e um declínio no desempenho da fibra com o tempo (MOREIRA *at al*, 2014).

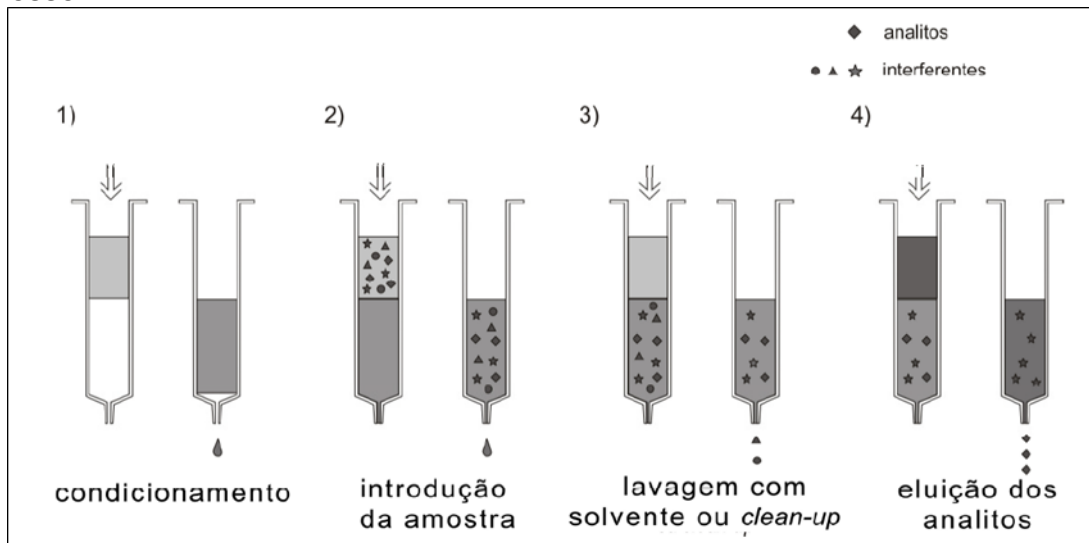
A EFS é uma das técnicas de extração mais usadas para extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas, também apresenta praticidade e maior sensibilidade, não formação de emulsões, facilidade de automação, elevadas porcentagens de recuperação do analito, capacidade de

aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorventes para EFS, se comparados a outras técnicas (JARDIM, 2010). Entretanto, também existem algumas limitações dessa técnica. Uma delas refere-se à etapa de dessorção do analito retido no cartucho de EFS que requer geralmente, o uso de solventes tóxicos. Além disso, proporciona desvantagens como o tempo elevado de análise, despesas com os cartuchos e, eventualmente, a dificuldade em eleger o sorvente adequado para a aplicação desejada. Além disso, os cartuchos são utilizados uma única vez e, geralmente, há baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartucho (JARDIM, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001)

O processo de retenção da EFS é um procedimento cromatográfico semelhante à CLAE, no qual os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo sorvente. Um composto orgânico hidrofóbico recobre ou está quimicamente ligado à sílica granulada formando a fase sólida extratora, como por exemplo, um octadecil (C18). Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para lavar os analitos de interesse, podendo ser apolar, moderadamente polar ou polar (SKOOG, 2006).

As técnicas de extração em fase sólida são realizadas através de membranas ou de pequenas colunas descartáveis na forma de seringas ou cartuchos (QUEIROZ, 2001; FONSECA, 2014). Normalmente, os procedimentos de extração em fase sólida contêm quatro etapas (Figura 5): 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; 2) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*; 4) eluição do analito.

Figura 5: Etapas de EFS no modo de concentração ou isolamento de analitos de interesse.




Fonte: Jardim, 2010

O processo de extração envolve interações intermoleculares que vão depender do analito, do solvente e da fase sólida. Nos casos das fases reversas (C8, C18 e CN), a retenção do analito acontece, primeiramente, devido às interações de Van der Waals não polares entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica. Na fase normal, as principais interações são entre grupos polares do analito e do solvente de eluição através de ligações de hidrogênio, interações π - π e dipolo-dipolo. Finalmente, no modo troca iônica as interações eletrostáticas são as responsáveis pela extração seletiva do analito (SNYDER *et al.*, 1997, SKOOG, 2006).

A SPE conta com uma grande variedade de adsorventes disponíveis, que podem ser empregados com os mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos, sendo essas características resumidas no Quadro 3 (QUEIROZ *et al.*, 2001; ORLANDO *et al.*, 2009).

Quadro 3: Características da EFS nos modos reverso, normal e troca iônica

	ANALITOS	MATRIZES	GRUPOS ADSORVENTES	SOLVENTES DE ELUIÇÃO
Fase Reversa	Apolares: fármacos, pesticidas, peptídeos	Aquosas: fluidos biológicos, água, tecidos, tampões	octadecilsilano $\equiv \text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ octilsilano $\equiv \text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ metilsilano $\equiv \text{Si}-\text{CH}_3$ cicloexilsilano $\equiv \text{Si}$ 	Metanol, acetonitrila, clorofórmio, hexano
Fase Normal	Polares: carboidratos, fenóis, metabólitos de vitaminas	Oleosas: óleos, lipídios, tecidos gordurosos	sílica $\equiv \text{Si}-\text{OH}$ alumina Al_2O_3 florisil MgO_3Si aminopropilsilano $\equiv \text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	Metanol, etanol, acetona
Troca Iônica	Catiônicos: bases iônicas ou ionizáveis (fármacos, herbicidas, catecolaminas)	Aquosas: fluidos biológicos, água, tecidos, tampões	Carboximetilsilano $\equiv \text{Si}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ sulfonilpropilsilano $\equiv \text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3 \text{Na}^+$	Tampões básicos ou com alta força iônica
	Aniônicos: ácidos iônicos ou ionizáveis (ácidos orgânicos, fármacos, vitaminas, ácidos graxos, fosfatos)	Aquosas: fluidos biológicos, água, tecidos, tampões	Dietilaminopropilsilano $\equiv \text{Si}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ trimetilaminopropilsilano $\equiv \text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	Tampões ácidos Ou com alta força iônica

Fonte: Adaptado de ORLANDO *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2001, JARDIM, 2010.

2.5 Validação da Metodologia Analítica

A validação de metodologias analíticas está descrita na literatura de várias maneiras, mas fundamentalmente trata-se de um processo que garante a confiabilidade e a qualidade da análise, envolve desde a capacidade técnica do analista, os equipamentos e todos os elementos empregados (VALENTINI, 2007).

Para uma técnica tornar-se eficiente, segundo Ribeiro e colaboradores (2007) é necessário que exista qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no desenvolvimento. Ao estabelecer os limites destes dois parâmetros através de figuras de mérito, se consegue assegurar a aplicabilidade e o alcance do método durante as operações de rotina laboratoriais.

A validação é uma comprovação, por meio de fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011), define que a validação de um determinado procedimento analítico deve estar adequada aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendam aos critérios de aceitação indicados, visando garantir a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.

No intuito de padronização dos parâmetros de validação de métodos analíticos, grupos de trabalhos de todo o mundo dispõem documentos para esse fim, e além das instituições nacionais já citadas, existem as instituições internacionais como: ICH (*International Conference on Harmonization*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), US-FDA (*United States Food and Drug Administration*), todas como o mesmo propósito (RIBANI *et al*, 2004).

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos, definindo critérios que devem seguidos durante processo de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão, os limites de detecção e quantificação (ROCA, *et al*, 2007; RIBANI *et al*, 2004, BRESSOLLE *et al.*, 1996; ARAGÃO, VELOSO E ANDRADE, 2009).

Na validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limite de quantificação (LQ). São conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI *et al*, 2004, BRITO *et al.*, 2003).

Sobre os parâmetros empregados neste trabalho, discorreremos a seguir:

2.6.1 Linearidade

A linearidade de um método indica a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável y , é linearmente proporcional à sua concentração, designada variável independente x . A equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como equação da reta, obtida através da curva analítica (RIBEIRO, 2008). De acordo com INMETRO (2003), a linearidade é obtida por padronização interna ou externa e

formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta relaciona as duas variáveis:

$$y = ax + b \qquad \text{Equação (1)}$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

A relação entre a absorbância (y) e a concentração do analito (x), descrita pela Equação (1) só é válida para o intervalo correspondente à faixa linear da curva analítica. Segundo Lanças (2004), a correlação é calculada pelo coeficiente de determinação R^2 .

A sensibilidade do método relaciona-se com o coeficiente angular da reta. A partir das áreas dos picos e das respectivas concentrações do padrão, a curva analítica é plotada e obtida a equação da reta, e o R quadrático, a partir desses, a inclinação da reta, ou seja, a sensibilidade do método.

2.6.2 Exatidão

A exatidão indica a proximidade da medida do valor verdadeiro, ou aceito, sendo expressa pelo erro absoluto ou pelo erro relativo em porcentagem (SKOOG, 2006).

A concordância entre resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como resultado verdadeiro é a exatidão do método. Ao aplicar em uma série de resultados de ensaio, provoca uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2003).

A exatidão pode ser obtida por meio do cálculo do erro relativo (ER), expresso em porcentagem (INMETRO, 2010). E ainda, conforme as normas da Resolução nº 899/03 (ANVISA, 2003), a exatidão pode ser calculada a partir da diferença percentual

entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança, de acordo com a Equação (2), a seguir:

$$\text{EXATIDÃO} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (2)$$

2.6.3 Precisão

De acordo com INMETRO (2003), a precisão é definida como a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, podendo ser expressa por meio da repetibilidade e da reprodutibilidade, e anunciadas pelo desvio-padrão. Ambas, repetibilidade e reprodutibilidade são comumente dependentes da concentração do analito e, para tanto, devem ser avaliadas com concentrações diferentes.

De acordo com ANVISA (BRASIL, 2010), podemos definir a precisão como sendo uma avaliação da proximidade dos resultados adquiridos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Desta forma, podemos alcançá-la em três níveis:

- a) Repetibilidade (ou precisão intra-corrída);
- b) Precisão Intermediária;
- c) Reprodutibilidade.

No presente trabalho, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, executadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, analista, instrumento empregado sob as mesmas condições, mesmo local, e repetições em um curto intervalo de tempo. Por outro lado, a precisão intermediária implica o efeito das variações dentro do laboratório em situações como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos. (RIBANI, 2003). A precisão dos dados analíticos é o grau de concordância mútua entre os dados que foram obtidos do mesmo modo.

Para tanto, a avaliação da precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (SKOOG, 2002). Para o DPR emprega-se a equação 3, a seguir (BRASIL, 2003):

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio Padrão (DP)}}{\text{Concentração Média Determinada (CMD)}} \times 100 \quad (3)$$

Para este cálculo é necessário obter previamente o DP e a CMD.

Para (POCINHO, 2009), o DP pode ser definido como a raiz quadrada da variância (VR), e a variância é caracterizada pela média dos quadrados dos desvios (S^2) de acordo com as equações 4 e 5, a seguir:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (4)$$

$$\text{DP} = \sqrt{S^2} \quad (5)$$

2.6.4 Especificidade e seletividade

Se o método permitir identificar exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, dizemos que ele possui especificidade e seletividade (ANVISA, 2003).

Segundo o INMETRO (2003), a especificidade e a seletividade estão relacionadas à ocorrência da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico e que produz respostas para vários analitos, mas no qual se pode distinguir a resposta de um analito em relação aos outros, é chamado seletivo.

Em uma abordagem qualitativa, em um teste de identificação, faz-se necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes.

2.6.5 Limite de detecção (LD)

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais (BARROS, 2002; INMETRO, 2003).

A ANVISA (2003) define que o LD é determinado através de soluções conhecidas e decrescentes, até o menor valor decrescente, onde o LD deve ser de 2 a 3 vezes maior que o sinal do ruído da linha da base. Para o INMETRO (2003) este sinal produzido pela concentração do analito deve ser três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

Matrizes ambientais geralmente têm inúmeros compostos que ocorrem em concentrações em níveis de traço. Segundo RIBEIRO *et al* (2008), analistas, quando desenvolvem métodos novos ou modificados para análise de traços, frequentemente definem LD em termos do desvio-padrão de medidas do branco. Entretanto, sendo o branco constituído de todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito, ele não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise. O LD determinado dessa forma pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. Entretanto, em relação à análise prática, esses valores são extremamente baixos e não representam a realidade.

O limite de detecção pode ainda ser determinado mediante a relação sinal/ruído, através do desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular, e também por processos estatísticos. O sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A razão sinal/ruído com valor 3 é considerada aceitável para estimar o LD (HUBER, 1998).

Segundo Ribeiro (2008) para se obter o valor de LD e de LQ, dever-se levar em consideração a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária: método visual, método da relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica.

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser determinada conforme a Equação (6).

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (6)$$

Onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas, no caso deste trabalho, contendo concentrações da cafeína próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva analítica.

2.6.6 Limite de quantificação (LQ)

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão, ou seja, representa a menor concentração da substância analisada que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. (ANVISA,2003, RIBANI *et al*, 2004)

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada (LANÇAS, 2004). Na presente pesquisa para o cálculo do limite de quantificação utilizou-se a relação descrita na ANVISA (2003), a Equação (7)., no qual DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 10 curvas de calibração construídas contendo concentrações da cafeína próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração:

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad (7)$$

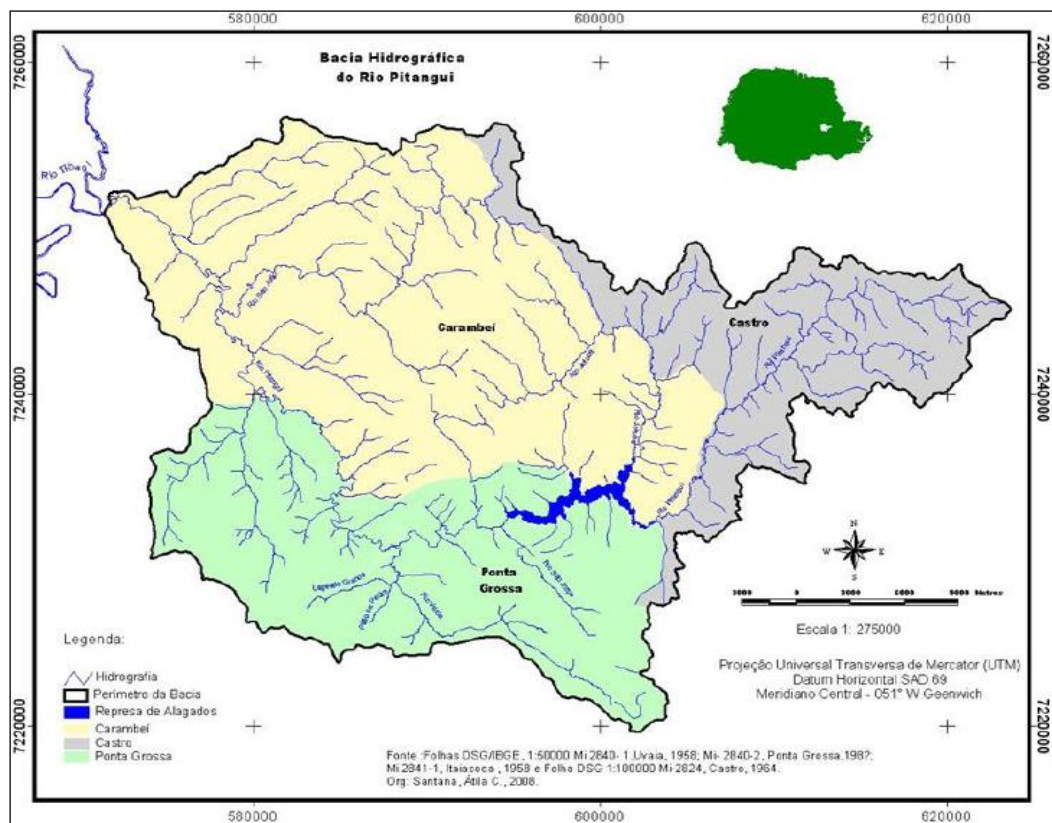
2.6 Taxa de recuperação

O INMETRO (2003) destaca que a taxa de recuperação de um analito pode ser considerada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas em pelo menos três diferentes concentrações na faixa de uso do método, com concentrações baixa, média e alta.

3. Local de Estudo

A Bacia do Rio Pitangui (Figura 6), possui um área aproximada de 927,3 km², e faz parte da Bacia Hidrográfica do Tibagi, que situa-se nos Campos Gerais, drenando parte dos municípios de Castro, Carambeí e Ponta Grossa, e que compreende cerca de 13% da área do estado do Paraná, com 24.937,4 km² (FONSECA, 2014, RIBICKI, 2013).

Figura 6: Bacia hidrográfica do Pitangui.



Fonte: Departamento de Geociências (UEPG)

O Rio Verde, que faz parte da Bacia do Rio Pitangui, tem sua nascente na área rural do município onde existem atividades agrícolas e de pecuária e, a seguir, no seu trajeto em direção ao Rio Pitangui, corta a área urbana onde há deficiência em saneamento básico e na qual apresenta suas margens ocupadas por habitações e outros empreendimentos. O rio, que é bastante utilizado para recreação, também recebe dos arroios urbanos uma carga de poluição significativa (SILVA, 2008). No final do percurso deságua no rio Pitangui que é responsável pelo abastecimento de 60% da população de Ponta Grossa através de captação direta, e que também forma a Represa de Alagados, responsável pelos outros 40% (SIERPINSKI, 2014).

Todo este trajeto traz consequências ao Rio Verde, que atualmente está bastante impactado, através do descarte de esgoto doméstico sem tratamento, lixo urbano, além da descarga de efluente da ETE Rio Verde da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR). Apresenta-se em grande parte de sua extensão, impróprio para consumo com alterações nas propriedades físico-químicas e elevada incidência de coliformes fecais (GEALH et al., 2010).

Os pontos de coletas, neste trabalho, estão localizados no Rio Verde, sendo o ponto P1 (Figura 7) sob um pontilhão, a montante do Matadouro municipal em uma área urbanizada, e os pontos P2 e P3 (Figura 8), respectivamente, a montante e a jusante da ETE Rio Verde. As amostras foram coletadas semanalmente durante os meses de abril e maio de 2016, totalizando 8 coletas. Foram, também, realizadas duas amostragens do efluente da ETE, em dias distintos, sendo as amostras submetidas a análises físico-químicas e determinação de cafeína.

Figura 7: Localização do Ponto de coleta P1.



Fonte: Google Maps® adaptado

Figura 8: Localização dos Pontos de coleta P2 e P3



Fonte: Google Maps® adaptado

Avaliar os efeitos das atividades antropogênicas sobre os locais de amostragem foi um aspecto relevante na escolha dos locais. O ponto P1 tem coordenadas S 25°04'22.6, W 50°06'33.7 (Figura 9) e está localizado numa região densamente povoada, com degradação ambiental visualmente percebida, com descarte de esgoto doméstico e lixo (SCHEFFER E BUSH, 2010; FONSECA et al, 2014, RIBICKI, 2013).

Figura 9: Ponto de coleta P1, Rio Verde em área urbana



Os pontos P2 e P3 localizam-se no Rio Verde (Figura 10), a montante (P2) e a jusante (P3) da ETE Rio Verde (Figuras 10 e 11), selecionados, com o propósito de verificar a influência do aporte do efluente no rio, e relacionar com a presença de cafeína.

Figura 10: Ponto de coleta P2, a montante da ETE Rio Verde



Fonte: O AUTOR

Figura 11: Ponto de coleta P3, a jusante da ETE Rio Verde



Fonte: O AUTOR

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Avaliar a potencialidade da utilização da cafeína como indicador de contaminação por esgoto doméstico em águas superficiais da Bacia do Rio Pitangui, no município de Ponta Grossa, Paraná, empregando CLAE e extração em fase sólida, previamente validados.

4.2 Objetivos Específicos

- Otimizar condições cromatográficas.
- Validar a metodologia aplicada (CLAE) através da avaliação das figuras de mérito: linearidade, precisão, especificidade, seletividade e limite de detecção e de quantificação.

- Realizar procedimentos de extração em fase sólida através de cartuchos C18, visando a pré-concentração da cafeína.
- Quantificar a cafeína em amostras de águas superficiais coletadas na Bacia do Pitangui.
- Determinar parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas, analisando os resultados com base na legislação vigente, e buscando relação entre aporte de esgoto e de efluentes com os dados obtidos.
- Relacionar as concentrações de cafeína com resultados de parâmetros físico-químicos referentes à qualidade da água.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados para determinação e quantificação da cafeína foram de grau de pureza P.A., ou ainda, em grau de pureza apropriado para as análises cromatográficas. Empregou-se água ultrapura obtida em um sistema um sistema Milli-Q (Millipore). A cafeína da marca Sigma Aldrich® com pureza mínima de 99%, Fosfato de sódio monobásico monohidratado, NaH_2PO_4 (Biotec), Hidróxido de sódio (Biotec); Metanol grau HPLC da Merck®; Molibdato de amônio, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (Biotec); Nitrato de prata, AgNO_3 (Merck); Soluções tampão pH=4,0 e pH=7,0 da marca Dinâmica-Química.

5.2 Equipamentos

- Aparato de filtração em policarbonato marca Millipore, para membrana 47 mm;
- Balança analítica marca RADWAG AS 220/C/2;
- Cartuchos marca *Applied Separation* para extração em fase sólida C18, contendo octadecil 18% e 500 mg de sílica, com volume extrator de 6 mL;
- Condutivímetro marca *Instrutherm* CD-860;

- Espectrofotômetro UV/VIS VARIAN, modelo CARY 50, utilizando-se células de quartzo com capacidade para 3 mL e caminho ótico de 5 mm;
- Cromatógrafo Allcrom YL9100, coluna C18 (550 mm x 4,6 mm x 5 mm) equipado com detector YL9120 UV/Vis operando em 273 nm,
- Espectrofotômetro Pastel UV – Secomam para SST, DQO, DBO, COT
- Membrana microfiltrante de acetato de celulose com 0,45µm de porosidade e Ø47 ±0,5 mm
- Analisador portátil LT Lutron DO-5519 para OD e Temperatura;
- pHmetro marca Mettler Toledo;
- Termômetro para determinação da temperatura ambiente
- Equipamento analisador de carbono Shimadzu TOC-VCPH

6 Metodologia

6.1 Preparação dos Materiais para Coleta e Análise

Todos os frascos de coleta e as vidrarias utilizados nas análises e na determinação da cafeína em amostras de águas superficiais, foram previamente lavados com detergente neutro, e em seguida, enxaguados com água corrente, com água do tipo Milli-Q, e em seguida, colocados em banho ácido em recipientes com tampa contendo solução de ácido nítrico HNO_3 1 mol L^{-1} , ficando o material imerso por, no mínimo, 12 horas. Antes da utilização, novamente enxaguados com água ultrapura por pelo menos cinco vezes, e com álcool isopropílico (PRISTA, 2012).

Ao manusear os reagentes ou os materiais foram utilizadas luvas descartáveis de polietileno e bandejas plásticas para que não houvesse contato direto de qualquer material com a bancada. Os frascos tampados foram embalados em sacos plásticos, e depois três a três, fechados e amarrados.

6.2 Procedimento de coleta

No local de coleta, os frascos utilizados foram enxaguados, pelo menos duas vezes, com a própria água a ser coletada, para ambientação. Informações sobre a

coleta, tais como: local, horário, número de amostras, temperatura ambiente e da amostra, observações sobre as condições ambientais do local de amostragem, entre outros, foram registradas.

Para efetuar as coletas das amostras um balde de polietileno foi utilizado, transferindo-se para os frascos com capacidade de 1L, posteriormente, colocados em sacos plásticos e acondicionados em uma caixa de isopor. Após a coleta as amostras foram conservadas a 4°C, para preparação e análises (PRISTA, 2012).

No laboratório, alíquotas das amostras a serem utilizadas na quantificação da cafeína, determinação da COD e de cloretos dissolvidos, foram filtradas sob pressão reduzida, através de membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade. Para a determinação dos outros parâmetros físico-químicos, as alíquotas *in natura* foram preservadas a 4°C, em refrigerador até a finalização de todas as análises.

6.3 Análises *in situ* das amostras de águas superficiais

No local foram determinados: temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido (OD). A temperatura ambiente foi medida em cada ponto de coleta com um termômetro comum de escala de -10°C a 110°C. A condutividade foi determinada com auxílio do condutivímetro portátil, mergulhando-se a sonda a cerca de 20 cm da superfície, obtendo-se a medida em mS e convertendo para a unidade de µS.

A concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi determinada com um analisador portátil que forneceu também a temperatura da água, sendo o procedimento o mesmo que para condutividade.

6.4 Análises de parâmetros físico-químicos em laboratório

Os seguintes parâmetros físico-químicos foram avaliados nas amostras coletadas: carbono orgânico dissolvido (COD), alcalinidade total, fósforo total (FT), cloreto dissolvido, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e pH.

Na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Ponta Grossa através de Espectroscopia de Absorção Molecular UV empregado um Espectrofotômetro Pastel UV – Secomam as análises de: demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), foram realizadas em triplicatas. A análise baseia-se na coleta de 1 mL da amostra sem pré-tratamento, devidamente homogeneizada para cada repetição. Esse volume é inserido na célula de quartzo, a qual é introduzida no equipamento. A leitura é realizada simultaneamente para os parâmetros mencionados anteriormente, em mg L⁻¹, pois o equipamento possui um banco de dados, que compara os índices obtidos com os existentes no mesmo. Destacando a importância da homogeneização, da troca de ponteira da micropipeta para cada amostra e da lavagem da célula de quartzo com água destilada e com a própria amostra (FONSECA, 2014).

Com o medidor de pH devidamente calibrado com as soluções tampão de pH=4,0 e pH=7,0, mediu-se o pH das amostras coletadas imediatamente após o retorno ao laboratório, efetuando a lavagem e secagem do eletrodo a cada medição. Realizou-se esse procedimento em triplicata para cada ponto de coleta.

Para quantificação dos íons cloretos foi utilizado o método de Möhr (Argentimetria) com detecção visual do ponto de equivalência através do indicador cromato de potássio, descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1999), pelo método 4500D. O método analítico se dá através de titulação por precipitação, utilizando solução de nitrato de prata como titulante e solução de K₂CrO₄ como indicador, sendo a amostra filtrada em membrana de acetato celulose 0,45 µm. Realizou-se esse procedimento em triplicata.

Os resíduos gerados nessa análise foram descartados em um recipiente apropriado para posterior tratamento.

6.4.1 Cloreto dissolvido

Para quantificação dos íons cloretos foi utilizado o método de Möhr (Argentimetria) com detecção visual do ponto de equivalência através do indicador cromato de potássio, descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1999), pelo método 4500D. O método analítico se dá através de titulação por precipitação, utilizando solução de nitrato de prata como titulante e

solução de K_2CrO_4 como indicador, sendo a amostra filtrada em membrana de acetato celulose 0,45 μm . Realizou-se esse procedimento em triplicata.

Os resíduos gerados nessa análise foram descartados em um recipiente apropriado para posterior tratamento.

Os resíduos gerados nessa análise foram descartados em um recipiente apropriado para posterior tratamento.

6.4.2 Alcalinidade total

Para determinação da alcalinidade total nas amostras *in natura*, foi utilizado o método 2540D descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1999), que consiste em uma titulação potenciométrica, expressa em $mg\ CaCO_3\ L^{-1}$, utilizando HCl purificado como titulante, até pH 4,5. Com agitação constante e o pHmetro devidamente calibrado, gotejou-se, com o auxílio de uma bureta de 5 mL, a solução de HCl 0,1 $mol\ L^{-1}$ até pH=4,5. O procedimento foi realizado em triplicata para cada ponto de coleta, sendo os volumes gastos empregados para o cálculo.

6.4.3 Fósforo Total (PT)

Para PT foi empregado o método Espectrofotométrico, com leitura em 660 nm, baseado em digestão ácida da amostra e posterior tratamento com ácido ascórbico (APHA, 1999).

Para a quantificação de fósforo total foi construída uma curva analítica utilizando KH_2PO_4 seco em estufa a 110° C por 1 hora. Partindo de uma solução estoque de 219,4 $mg\ L^{-1}$, as concentrações para elaboração da curva analítica foram 0,27 $mg\ L^{-1}$, 0,41 $mg\ L^{-1}$, 0,55 $mg\ L^{-1}$, 0,82 $mg\ L^{-1}$, 1,10 $mg\ L^{-1}$, 1,6 $mg\ L^{-1}$ e 2,2 $mg\ L^{-1}$ da solução padrão de fosfato.

6.4.4 Carbono Orgânico Dissolvido

As determinações de COD foram realizadas de acordo com o método SM5310B (APHA, 1995), através de combustão catalítica e detecção no infravermelho não dispersivo em um equipamento analisador de carbono Shimadzu TOC-VCPH. Para análise utilizou-se 20 ml das amostras de cada ponto (P1, P2, P3), armazenadas em frasco de vidro âmbar com tampa e batoque, acidificadas com 20 µL de ácido sulfúrico concentrado, etiquetadas e encaminhadas para análise no Laboratório Multiusuário da UEPG.

8 Determinação da cafeína

Para determinação da concentração de cafeína nas amostras de água e no efluente tratado do esgoto da ETE, utilizou-se método cromatográfico – CLAE com detector UV-Vis em 273nm. As condições experimentais: fase móvel, vazão, temperatura, tempo de retenção e volume de injeção foram avaliadas e otimizadas com base em dados da literatura e no funcionamento do equipamento.

8.1 Otimização da metodologia para análise da cafeína por CLAE

A escolha da metodologia analítica empregada nesta pesquisa, foi realizada a partir da literatura sobre o uso do CLAE na determinação de micropoluentes emergentes em níveis de traços em amostras naturais, especialmente na determinação e quantificação da cafeína (GONÇALVES, 2008, SILVA e COLLINS, 2011, FONSECA, 2014, MOURA, 2015).

Para iniciar a otimização, as condições cromatográficas foram estipuladas. A coluna C18 (550 mm x 4,6 mm, 5 µm) Luna foi selecionada, devido ao seu alto grau de compatibilidade com cafeína. A temperatura programada para 25° C e a vazão em 1,0 ml/min com base na literatura (CLAUSEN, 2015), como também nos parâmetros de ajuste empregados no mesmo equipamento para análises de outras soluções aquosas contendo cafeína, tais como chás naturais e industrializados.

8.2 Calibração

Soluções padrão de cafeína foram preparadas a partir de solução inicial com concentração de 500 mg L⁻¹. Para tanto, pesou-se 0,05 g da cafeína e adicionou-se em balão volumétrico com capacidade de 100 mL, acrescentando-se 22 mL de Metanol grau HPLC da Merck®, completando-se o volume do balão com água ultrapura. A solução foi devidamente homogeneizada. A partir desta solução, foram preparados os padrões para efetuar a curva analítica com concentrações entre 0,1 a 2,0 mg L⁻¹.

8.3 Condições cromatográficas

A análise das amostras naturais quanto à presença de cafeína foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) adaptada de GONÇALVES (2008), em um equipamento YL9100 CLAE *System* equipado com detector YL9120 UV/Vis operando em 273 nm. A coluna analítica utilizada de fase normal C18 (550 mm x 4,6 mm, 5 mm) Luna, mantida em temperatura de 25°C.

A fase móvel empregada foi uma mistura de metanol (solvente B) e água (solvente A) em uma proporção de 22:78 v/v operando em modo isocrático, fluxo de 1,0 ml min⁻¹ por um tempo total de 10 minutos com pressão de aproximadamente igual a 1450 PSI, volume de injeção de 20 µL e os espectros obtidos através do programa *YL Clarity*.

Os solventes utilizados todos em grau cromatográfico, a água deionizada Milli-Q®, e a cafeína da marca Sigma Aldrich®. Análises foram realizadas no laboratório de Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), no município de Ponta Grossa/PR.

8.4 Extração em fase sólida (EFS ou SPE)

Cartuchos de extração em fase sólida C18/18 foram utilizados, os quais continham octadecil 18% e 500mg de sílica, para um volume extrator de 6 ml, da Marca *Applied Separation*. A técnica procura pré-concentrar o analito (cafeína) contido em 1 litro de cada amostra de água, através do sorvente octadecil silano-C18 contido

no cartucho, e para isso foi utilizado o equipamento *Manifold*, com capacidade para doze cartuchos, acoplado a uma bomba a vácuo com o fluxo de vazão na pressão de 3 ml min^{-1} (GONÇALVES, 2008).

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Validação analítica

As figuras de mérito selecionadas, no presente estudo, para testar o desempenho da metodologia foram:

- a) Linearidade
- b) Exatidão
- c) Precisão;
- d) Especificidade e seletividade
- e) Limite de detecção
- f) Limite de quantificação
- g) Taxa de recuperação
- h) Validação do cartucho

Para a elaboração da curva analítica para a cafeína, foram realizadas aplicações das amostras padrão, em três dias distintos com sete concentrações diferentes, aplicada em triplicatas, que variaram de $0,0$ a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, como observa-se na tabela 1. A linearidade foi obtida a partir da curva analítica das amostras padrões de cafeína com um coeficiente de determinação médio (R^2) de $0,9986$, fato destacado na figura 12.

TABELA 1 – Valores obtidos através da CLAE para a construção da curva analítica.

Dados para elaboração da Curva Analítica								
Concentrações (mg L^{-1})	0,0	0,10	0,20	0,50	0,70	1,00	1,50	2,00
Dia 1: 1ª área	0,0	4,8	9,9	22,4	33,8	54,1	78,1	106,8
Dia 1: 2ª área	0,0	4,8	9,8	22,7	34,1	50,7	77,3	107,7
Dia 1: 3ª área	0,0	4,9	10,5	22,4	33,9	52,3	78,6	105,1

TABELA 1 – Valores obtidos através da CLAE para a construção da curva analítica.

(Continua)

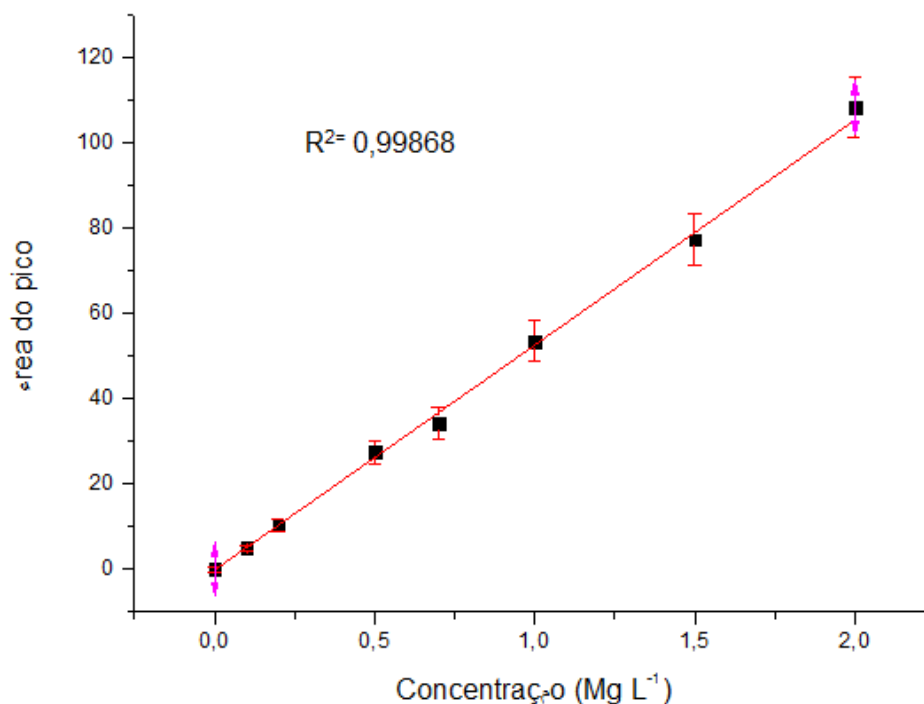
Dia 2:	1ª área	0,0	5,0	11,6	28,1	34,5	52,6	78,5	107,7
Dia 2:	2ª área	0,0	4,7	10,0	25,5	33,7	52,3	78,6	111,3
Dia 2:	3ª área	0,0	5,2	9,2	29,0	34,9	55,6	75,1	106,1
Dia 3:	1ª área	0,0	5,2	10,5	24,8	34,8	50,8	78,5	107,7
Dia 3:	2ª área	0,0	5,1	11,7	24,5	34,0	52,2	80,0	107,7
Dia 3:	3ª área	0,0	5,2	10,7	24,5	34,3	52,2	79,2	109,0
Desvio Padrão		0,0	0,20	0,82	2,38	0,42	1,52	1,36	1,74
Média das áreas		0,0	4,5	9,4	22,4	30,9	47,4	70,5	97,1

Fonte: O AUTOR

Depois do cálculo da média das triplicatas das áreas para cada concentração, obtidas experimentalmente, a curva analítica foi construída com o auxílio do software *Origin 9.0*[®] e está demonstrada na Figura 15. O valor do R^2 obtido está de acordo com o protocolo da ANVISA (2003) que estabelece no mínimo 0,99. A equação da reta obtida é dada por:

$$y = 53,52578x - 1,02296.$$

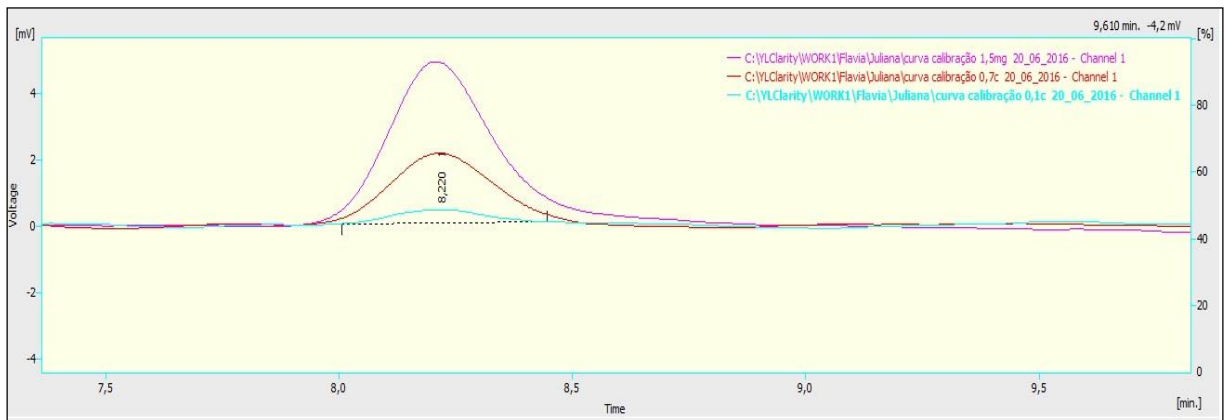
Figura 12: Curva Analítica para a cafeína em comprimento de onda de 273 nm



Fonte: O AUTOR.

A partir da injeção dos padrões para elaboração da curva analítica, pode-se observar que o tempo de retenção da cafeína para as concentrações avaliadas está em torno de 8 e 8,5 minutos, conforme Figura 13.

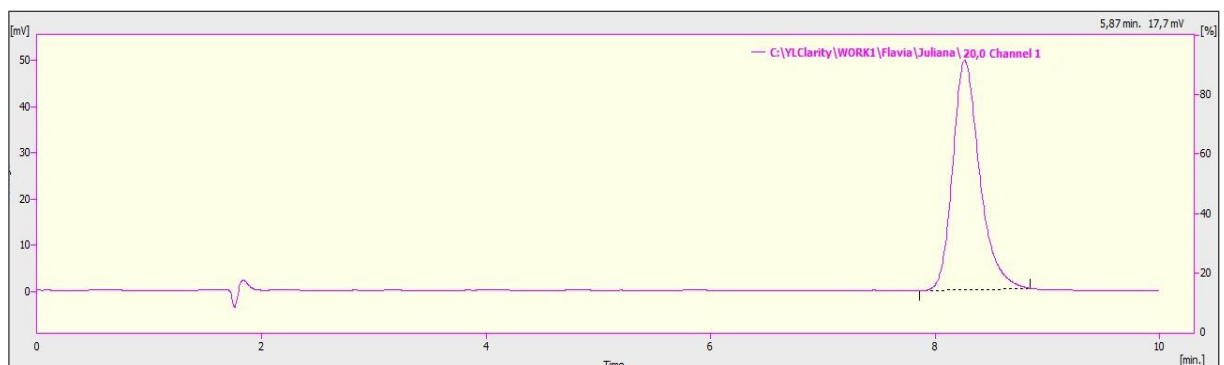
Figura 13: Cromatogramas obtidos na análise de cafeína em diferentes concentrações. Verificação do tempo de retenção, com Água/MetOH 78:22 em 273 nm



Fonte: O AUTOR

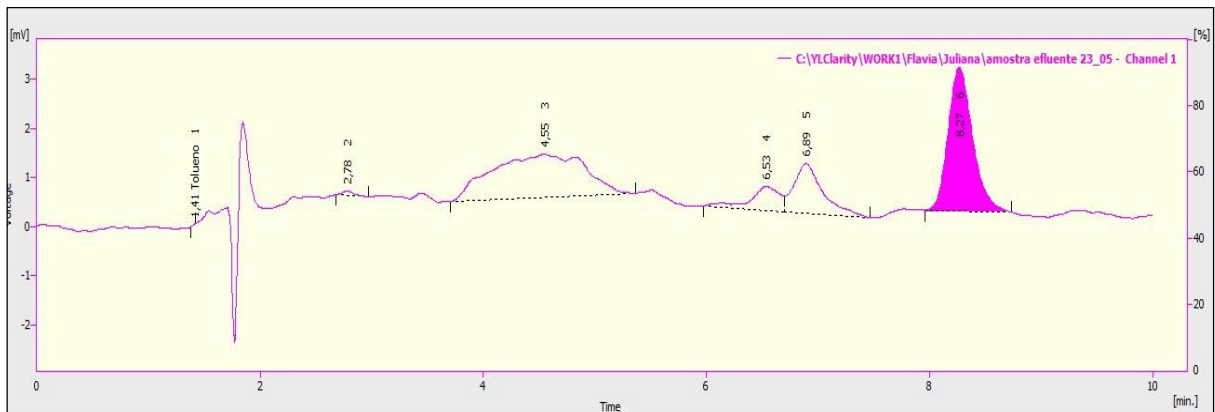
O tempo de retenção da cafeína nestas condições experimentais ficou em torno de 8,25 minutos, usando como fase móvel metanol e água 22:78, v/v, detecção em comprimento de onda de 273 nm. As condições experimentais foram satisfatórias para determinação da cafeína em águas superficiais e em efluente tratado da ETE, conforme pode ser observado nas figuras 14 e 15.

Figura 14: Cromatograma de padrão de cafeína 20,0 mg L⁻¹



Fonte: O AUTOR

Figura 15: Cromatograma de amostra de efluente tratado de ETE



Fonte: O AUTOR

Para realizar o cálculo de exatidão foi estabelecido um intervalo linear, ou seja, 3 concentrações: a concentração baixa de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, a concentração média ($0,7 \text{ mg L}^{-1}$) e a concentração alta ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$). Todas as amostras de padrão de cafeína foram analisadas em triplicata em dias distintos àqueles utilizados para realização da curva analítica. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 2

TABELA 2 – Ensaio Analítico para avaliação da exatidão da técnica.

Leituras	Concentrações mg L^{-1}		
	0,100	0,700	2,00
1ª leitura	0,118	0,671	2,02
2ª leitura	0,119	0,656	2,02
3ª leitura	0,120	0,661	2,04
Média	0,12	0,66	2,03
Desvio Padrão	0,001	0,007	0,014
Exatidão	119,1	94,7	101,4

Fonte: O Autor

A exatidão do método foi obtida através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Segundo a ANVISA (2003), todos os valores obtidos encontram-se dentro do estabelecido pela legislação a qual determina valores entre 80 e 120% de alcance do teor do analito em pesquisa.

Para avaliar a precisão da técnica, tanto da repetibilidade como da precisão intermediária, foram injetados novos padrões de cafeína com concentrações idênticas aos da curva analítica. Para tal, foram calculados o desvio padrão e o desvio padrão relativo, para obter posteriormente a precisão. Os padrões foram injetados em dias distintos àqueles da elaboração da curva analítica.

O desvio padrão (DP) mede a proximidade dos valores agrupados em torno da média. Para ANVISA (BRASIL, 2003), o valor mínimo do DP deve ser 0 e o máximo não pode exceder 5%, indicando que não há variabilidade, ou seja, que todos os valores são iguais à média.

Com os padrões de cafeína em concentrações variando 0,1 a 2,0 mg L⁻¹, conforme observados na tabela 6, os mesmos foram aplicados em dias distintos aos dos utilizados para elaboração da curva analítica, as concentrações médias dos padrões de cafeína foram calculadas a partir dos desvios-padrão de repetibilidade (S) e os coeficientes de variação (%) das amostras fortificadas em cada nível de concentração.

Considerando a área para a faixa de concentrações da cafeína na curva analítica, em 273 nm, obtêm-se os seguintes valores para o seguinte DP e para a VR (Tabela 3), utilizando-se da equação 3, anteriormente citada.

Tabela 3 – Desvio Padrão para os ensaios de repetibilidade na faixa de concentração de 0,1 a 2,0 mg L⁻¹

Concentração (mg L⁻¹)	0,10	0,20	0,50	0,70	1,00	1,50	2,00
1ª leitura	0,11	0,23	0,54	0,66	1,00	1,48	2,02
2ª leitura	0,10	0,20	0,50	0,64	1,00	1,48	2,08
3ª leitura	0,11	0,19	0,55	0,66	1,05	1,41	2,00
Média	0,11	0,21	0,53	0,65	1,02	1,46	2,03
Desvio Padrão	0,01	0,02	0,03	0,01	0,03	0,04	0,04
Variância	3,3E-05	0,0004	0,0010	0,0001	0,0008	0,0016	0,0017

Fonte: O Autor

O DP é uma medida que indica a dispersão dos dados dentro da amostra, isto é, o quanto os resultados diferem da média. Por isso que ele sempre é apresentado junto da média. Um não faz sentido sem o outro. Quanto menor o DP, mais homogêneo é o resultado.

Uma vez obtido o DP, pode-se então calcular DPR que evidencia a precisão do método. Este valor consiste na razão do DP pela concentração média determinada (CMD) expressa em % (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de Desvio Padrão Relativo (DPR)

Concentração Teórica (mg L⁻¹)	DPR (%)
0,1	5,40
0,2	10,1
0,5	6,10
0,7	1,80
1,0	2,80
1,5	2,80
2,0	2,10

Fonte: O Autor

No que diz respeito à precisão, ou seja, a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla, o método pode ser considerado com precisão satisfatória, uma vez que de acordo com ANVISA (2003) o valor não deve ultrapassar 5%.

Para a metodologia implantada conforme as condições experimentais descritas anteriormente, DPR tem um valor médio de 4,43% o que pode ser considerado um bom resultado de acordo com critérios da ANVISA (2003).

A precisão intermediária (Tabela 5) foi obtida em condições idênticas ao experimento de repetitividade, porém em dia diferente ao utilizado para elaboração da curva analítica e da repetibilidade. A Tabela 5 exibe o desvio padrão, o desvio padrão relativo e o coeficiente de variação em cada nível de concentração, para verificação da precisão intermediária, a qual apresentou valores satisfatórios, estando em acordo com a legislação do INMETRO e da Anvisa (2003), com um valor médio do DPR igual a 1,52 % (INMETRO, 2011, SANTANA, 2013).

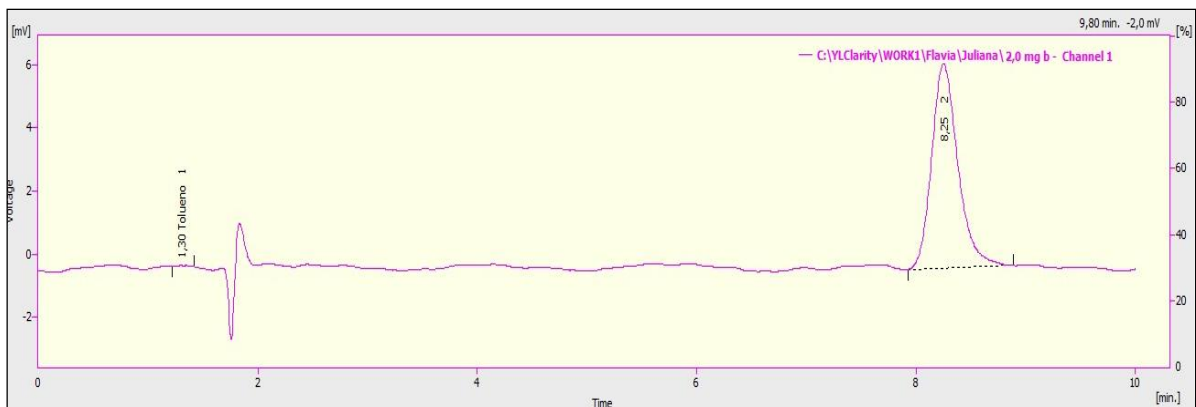
Tabela 5 – Precisão intermediária na faixa de concentração de 0,1 a 2,0 mg L⁻¹

Concentração (mg L ⁻¹)	0,10	0,20	0,50	0,70	1,00	1,50	2,00
1ª leitura	0,12	0,22	0,49	0,67	0,97	1,48	2,02
2ª leitura	0,12	0,24	0,48	0,66	0,99	1,51	2,02
3ª leitura	0,12	0,22	0,48	0,66	0,99	1,49	2,04
Média	0,12	0,23	0,48	0,66	0,98	1,49	2,03
Desvio Padrão	0,001	0,012	0,003	0,007	0,015	0,014	0,014
Variância	8,52E-07	9,18E-05	1,14E -06	1,31E-05	2,49E-05	5,59E-05	1,50E-04
DPR	0,75	5,22	0,58	1,12	1,48	0,95	0,68

Fonte: O Autor

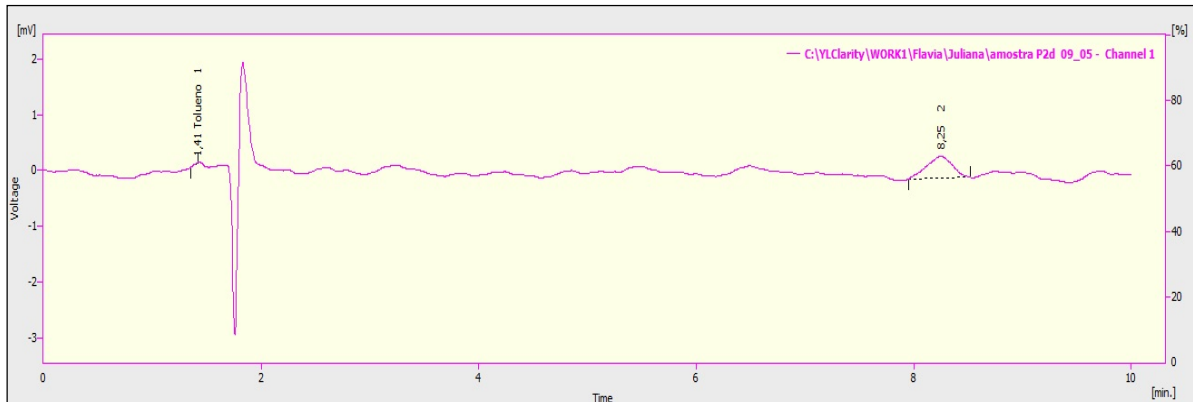
Para verificar a especificidade e seletividade do método, avaliou-se a influência dos componentes da matriz, visto que numa amostra ambiental a complexidade da matriz é um fator interferente na análise. Nesse sentido, fez-se uma comparação da análise cromatográfica do padrão de cafeína com concentração conhecida (FIGURA 16) e outro com a amostra de água superficial coletada no dia 09 de maio de 2016 (FIGURA 16).

Figura 16: Cromatograma obtido para solução padrão de cafeína com concentração conhecida: 2 mg L⁻¹



Fonte: O Autor

Figura 17: Cromatograma obtido para amostra de água superficial.



Fonte: O Autor

Os cromatogramas apresentados acima demonstram que os constituintes da matriz ambiental não interferiram no pico cromatográfico da cafeína que foi obtido aproximadamente em 8,3 min. Assim, pode-se afirmar de acordo com os dados apresentados, nas condições experimentais analisadas, que a determinação da cafeína em amostras de água superficial pode ser realizada.

Para o cálculo do limite de Detecção (LD), foram utilizadas três curvas analíticas obtidas em dias distintos, sendo calculados a inclinação da curva analítica e o desvio padrão do intercepto com o eixo y destas curvas. O LD obtido foi igual a $0,010 \text{ mg L}^{-1}$ (FIGURA 17).

O limite de quantificação foi calculado a partir de dez curvas analíticas, conforme recomendações da Anvisa (2003), sendo igual a $0,034 \text{ mg L}^{-1}$. Portanto, está dentro dos valores preestabelecidos na escolha para a elaboração da curva analítica.

Também foi verificada a taxa de recuperação de cafeína em amostras reais. Para tanto, amostras de água superficial foram fortificadas com solução padrão de cafeína de concentrações conhecidas e submetidas à análise cromatográfica. Inicialmente, obteve-se a área do pico obtido para as soluções padrão com concentrações conhecidas: $0,1 \text{ mg L}^{-1}$; $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, para que assim, fosse determinada a taxa de recuperação das amostras reais de cafeína conforme a Tabela 6 indica.

TABELA 6 Ensaios de recuperação da cafeína em amostras de águas superficiais.

Concentração mg L⁻¹	0,1	0,7	2,0
Solução padrão (concentração experimental) mg L⁻¹	0,12	0,77	2,2
Amostras reais (concentração experimental) mg L⁻¹	0,11	0,78	2,1
Taxa de recuperação em %	110,4	99,5	100,3

Fonte: O Autor

10 Validação do Cartucho

Para avaliar a eficiência do cartucho C18/18, utilizado na pré-concentração das amostras superficiais e amostras de efluentes tratados, estudos foram realizados através de ensaios de recuperação de solução padrão de cafeína, em triplicata.

Inicialmente, o cartucho C18/18 foi ativado com 6 ml de metanol, depois um volume de 1000 ml de padrão de cafeína de concentração de 5 mg L⁻¹ foi pré-concentrado nesse cartucho, sob pressão reduzida. Em seguida, realizou-se a eluição com 6 ml de MtOH, sendo uma alíquota desse pré-concentrado injetada para análise cromatográfica. Os ensaios cromatográficos foram realizados em triplicata para a validação do cartucho.

TABELA 7: Ensaios para validação cartucho C18/18.

	Área do pico inicial	Concentração inicial	Área do pico após a injeção	Concentração após a pré-concentração do cartucho	Recuperação em %
Injeção 1	39,1	0,75	20,8	0,41	53,2
Injeção 2	39,3	0,76	20,0	0,40	51,0
Injeção 3	39,0	0,75	20,6	0,41	52,9
Média	39,1	0,75	20,5	0,41	52,4
DP	0,15	0,18	0,40	0,03	1,20

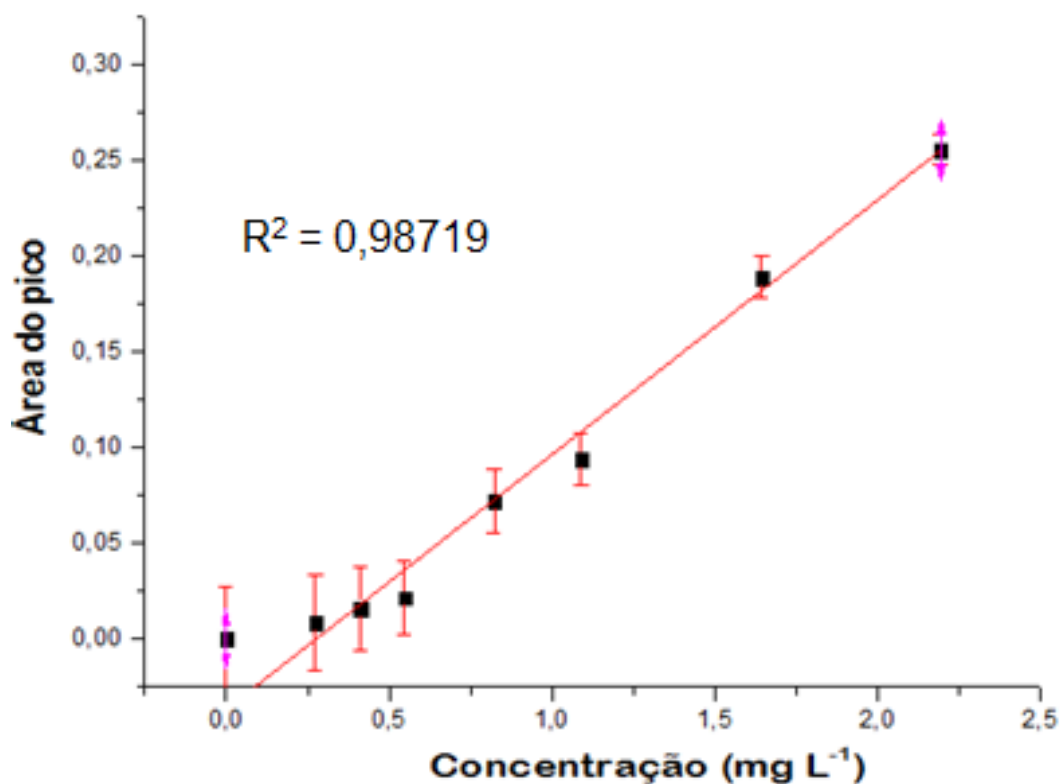
Fonte: O Autor

11 Curva Analítica para Fosfato

Seguindo técnica descrita no *Standard Methods* (APHA, 1999) para a determinação quantitativa do fósforo total pelo método do Ácido Ascórbico Método 4500 - PE, realizou-se a análise que acontece em duas etapas: i) conversão de todas as formas de fósforo para ortofosfato por digestão com ácido sulfúrico e ácido nítrico e ii) determinação espectrofotométrica em 660 nm pelo método do ácido ascórbico.

Assim, obteve-se as absorvâncias na análise em triplicata para cada concentração, e a partir das médias de absorvância relacionadas às concentrações, foi construída a Curva Analítica (Figura 18). Observa-se que R^2 igual a 0,98719, sendo satisfatório.

Figura18: Curva analítica para determinação do Fósforo Total obtida em 660 nm



Fonte: O Autor

12. Caracterização físico-química dos pontos amostrais em estudo

A caracterização dos corpos aquáticos foi realizada buscando conhecer os efeitos de ocupação da bacia sobre a qualidade das águas, e também para subsidiar o estudo da cafeína como marcador do aporte de esgoto. A seguir estão apresentados os resultados obtidos.

12.1 Oxigênio Dissolvido (OD) e Temperatura (°C)

As variações na temperatura ambiente repercutem nas temperaturas de ambientes aquáticos superficiais, que por sua vez influenciam nos processos biológicos e reações químicas, e sobre vários parâmetros físico-químicos como a densidade, a viscosidade e a pressão de vapor do meio líquido. A temperatura é inversamente proporcional à solubilidade de gases dissolvidos, sendo que aumento de temperatura da água resulta na redução das concentrações dissolvidas do gás oxigênio e no aumento do consumo de oxigênio devido ao estímulo às atividades biológicas (SCHEFFER, 2006).

Na tabela 8 observam-se os valores comparativos dos índices de OD e temperatura nos três pontos amostrais de coleta, P1, P2 e P3.

TABELA 8: Concentração de OD e Temperatura da água para os pontos amostrais nas 8 coletas realizadas

	P1		P2		P3	
	T água (°C)	OD (mg L ⁻¹)	T água (°C)	OD (mg L ⁻¹)	T água (°C)	OD (mg L ⁻¹)
05/abr	21,2	6,6	22,2	5,7	22,7	5,0
11/abr	21,3	6,8	22,1	6,3	23,1	6,1
18/abr	21,1	6,7	22,2	6,6	22,9	5,9
25/abr	20,6	5,9	20,6	4,9	22,7	4,7
02/mai	12,8	5,3	14,6	6,6	15,2	5,1
09/mai	18,5	5,1	18,1	5,6	18,1	6,9
16/mai	18,5	4,5	18,3	6,4	18,3	6,7
23/mai	15,5	7,4	15,4	7,3	16,2	7,0
MÉDIA	18,7	6,0	19,2	6,2	19,9	5,9
DP	1,00	3,11	0,74	3,07	0,91	3,31

Fonte: O Autor

A concentração de OD indica, principalmente, as condições de preservação do corpo aquático, e no caso dos rios estudados, não é possível estabelecer uma relação direta entre a variação de temperatura e as concentrações de OD. Deve-se considerar que as concentrações de OD em meio aquático podem ser influenciadas de forma determinante pelo aporte de matéria orgânica, especialmente em locais onde existem ligações irregulares e ocupações das margens, e nesses casos representa um fator que se sobrepõe à influência da temperatura.

O ponto P1 localizado no Rio Verde apresentou concentrações para OD entre 4,5 e 7,4 mg L⁻¹. Nesse ponto, o rio que nasce na área rural, já cortou uma área urbana com carência em saneamento básico e com parte de suas margens ocupadas por habitações. Entretanto, o Rio Verde em seu percurso até esse local apresenta pequenas quedas e corredeiras, o que segundo Cox (2003) gera maior turbulência, fato que facilita sua aeração, e assim influencia positivamente às concentrações de OD observadas.

O ponto P2 também localizado no Rio Verde, a montante da ETE, apresentou concentrações de OD entre 4,9 e 7,3 mg L⁻¹ sendo mais elevadas quando comparadas às concentrações de OD de P3 em seis das oito coletas. Observa-se, assim, um decréscimo na concentração de OD na medida em que o Rio Verde recebe o descarte do efluente da ETE, pois P3 está à jusante da estação.

Trabalhos destacam que o descarte de efluente tratado nos mananciais tende a diminuir a quantidade de OD (FONSECA *et al.*, 2014, RIBICKI, 2013). Embora haja influência sazonal determinada pela variação de temperatura, a redução das concentrações do OD está principalmente relacionada ao aumento na concentração de matéria orgânica no corpo aquático. Se a concentração de OD é baixa, isso pode também indicar que ele está sendo consumido no próprio ambiente aquático através da intensa atividade bacteriana realizada para decompor a matéria orgânica (SCHEFFER E BUSCH, 2010)

Em rios como o Verde, classificados como Classe 2, a Resolução CONAMA 357 (2005), estabelece para as concentrações de OD um limite mínimo de 5 mg L⁻¹. Neste trabalho, as concentrações de OD estiveram próximas ou abaixo desse limite em diversas coletas, dependendo do ponto amostral. Entretanto visto a descrição do Rio Verde (P1) com sua capacidade de oxigenação que pode mascarar a impactação, e o fato da redução de OD com o descarte do efluente da ETE no Rio Verde,

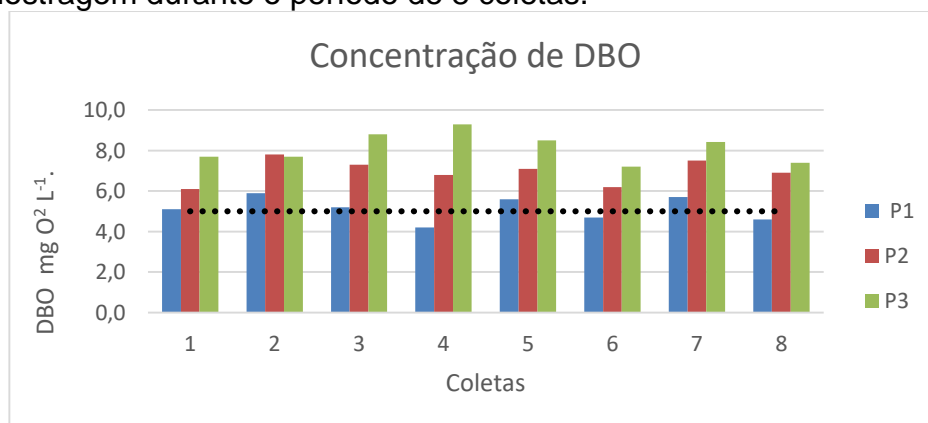
considera-se que uma avaliação criteriosa das concentrações de matéria orgânica deve ser realizada.

12.2 Matéria Orgânica

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é um parâmetro indispensável nos estudos de caracterização de esgotos sanitários e de efluentes industriais. Indicador que determina indiretamente a concentração de matéria orgânica biodegradável através da demanda de oxigênio exercida por microrganismos através da respiração. A DBO é um teste padrão, realizado a uma temperatura constante de 20°C e durante um período de incubação também fixo, de 5 dias. (VALENTE *et al.* 1997; FONSECA, 2014). A legislação vigente (CONAMA, 357/05) determina concentrações de DBO em até 5 mg L⁻¹ O₂ para rios de classe 2, classificação na qual o Rio Verde está incluso.

O consumo de oxigênio nas análises de DBO, realizadas nesta pesquisa, foi compatível com ambientes ricos em matéria orgânica. O ponto P1, localizado no Rio Verde em área urbana apresentou valores de concentrações de DBO de acordo com sua classificação apenas em três coletas, sendo que para P2 e P3, localizados respectivamente a montante e a jusante da ETE, em todas as coletas, o limite estabelecido para a Classe 2 foi ultrapassado. Baseado nesse parâmetro, o Rio Verde seria classificado como Classe 3, que de acordo com a Resolução CONAMA, apresenta DBO de até 10 mg L⁻¹ O₂. Verifica-se, novamente, que após a ETE, a qualidade da água é reduzida, visto o aumento na DBO em P3 (Figura 19).

Figura 19: Gráfico comparativo entre os valores de DBO obtidos para os três pontos de amostragem durante o período de 8 coletas.



Fonte: O Autor

Pode-se dizer que quanto maior for o volume lançado de esgotos ou efluentes orgânicos em um determinado sistema aquático, maior será o consumo de oxigênio provocado no mesmo, ou seja, quanto maior for a concentração de matéria orgânica, maior será a "demanda de oxigênio".

Sobre o conteúdo orgânico de águas superficiais, pode-se também empregar a demanda química de oxigênio (DQO) como seu indicador, apesar da resolução CONAMA 357/05 não fazer referência a este parâmetro na classificação dos corpos d'água, ficando restrito a apenas algumas legislações ambientais estaduais que estabelecem seus limites.

No caso do Rio Verde em área urbana (P1), a DQO mostrou valores semelhantes (Tabela 9) em praticamente todas as coletas, com valor médio em torno de 11 mg L⁻¹. Observa-se a DQO mais elevada para as amostras de P3 com valor médio de 19 mg L⁻¹. O aporte de efluente da ETE aumenta a carga orgânica no rio, aumentando a demanda por oxigênio nas reações de oxidação.

TABELA 9: Concentrações de DQO obtidos para os três pontos de amostragem durante o período de 8 coletas.

Pontos de coleta	Concentração DQO mg L ⁻¹									
	1	2	3	4	5	6	7	8	MÉDIA	DP
P1- Rio Verde	11,3	12,8	12,1	9,6	12,6	10,4	12,9	11,6	11,7	1,11
P2- Rio Verde, montante a ETE	13,6	17,7	17,1	14,9	17,3	16,3	17,5	12,6	15,9	1,82
P3- Rio Verde, jusante a ETE	18,3	22,8	20,3	18,5	21,0	18,9	19,4	15,6	19,3	1,99

Fonte: O Autor

Além de análises de DBO e DQO, uma forma direta para avaliar a concentração de matéria orgânica presente em águas superficiais é a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD). Neste trabalho, as determinações de COD (Tabela 10) foram realizadas através de combustão catalítica e detecção no infravermelho não dispersivo em um equipamento analisador de carbono (APHA, 1995).

O ponto P3, localizado a jusante a ETE, comparativamente aos demais, apresentou as concentrações mais elevadas de COD, com valores de até 9,6 mg L⁻¹,

confirmando uma vez mais o enriquecimento da água com matéria orgânica após o descarte do efluente da ETE. O estudo deve ser comparativo, pois a legislação não contempla limites para COD.

TABELA 10: Concentração de COD para os pontos amostrais

	P1- Rio Verde área urbana	P2 - Rio Verde montante a ETE	P3 - Rio Verde jusante a ETE
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Coleta 1	2,7	4,3	4,6
Coleta 2	5,0	5,8	9,6
Coleta 3	4,3	7,9	3,5
Coleta 4	1,9	3,1	4,2
Coleta 5	2,1	3,8	3,6
Coleta 6	1,9	2,8	4,5
Coleta 7	3,9	4,7	4,5
Coleta 8	5,8	5,3	5,8
MÉDIA	3,4	4,7	5,0
DP	1,5	1,6	2,0

Fonte: O Autor

Valores superiores de COD para as amostras coletadas em P1 e P2 podem ser indicativos de contribuições antropogênicas, provavelmente associadas ao descarte de esgoto. A presença do aporte de esgoto em águas superficiais, além de contribuir para redução nos níveis de OD, aumenta as taxas de produção primária, favorecendo o aumento dos níveis de COD nestes ambientes. O desenvolvimento de ambientes anóxicos também permite a proliferação de microrganismos anaeróbios e produção de mercaptanas e sulfetos, que caracterizam o mal cheiro em ambientes impactados (STUM E MORGAN, 1996).

Índices elevados de matéria orgânica caracterizados por parâmetros como: DBO, DQO e COD, podem indicar um incremento da microflora presente, que interfere no equilíbrio da vida aquática, além de produzir sabores e odores desagradáveis, podendo obstruir filtros de areia utilizados nas estações de tratamento de água (TEODORO e SANTOS, 2009).

12.3 Condutividade, Alcalinidade total e Cloreto dissolvido como indicativos de atividade antropogênica

Outro parâmetro determinado em todas as amostras foi a condutividade, que se relaciona à concentração de substâncias iônicas dissolvidas no meio. Em águas superficiais, níveis superiores a $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ indicam ambientes impactados (CETESB, 2009). A condutividade depende das concentrações iônicas e da temperatura, e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. Grandes variações decorrem do lançamento de despejos industriais e de mineração, e de esgotos domésticos.

Nessa pesquisa, os valores de condutividade foram determinados *in situ*, em temperaturas que variaram entre 13 e 23°C, apresentando na 2ª coleta os valores máximos para os três pontos. Destaque-se o maior valor obtido nesse trabalho foi de $113 \mu\text{S cm}^{-1}$ para amostra de P3, que é o ponto de coleta onde em praticamente todas as amostragens verificaram-se os maiores valores de condutividade, com exceção das duas últimas que ocorreram em período de chuva. Não há referências quanto à condutividade elétrica nas resoluções ou portarias consultadas: Resolução CONAMA n. 357/2005 e Resolução CONAMA n. 430/2011; Portarias do Ministério da Saúde n. 1469/2000 e n. 2914/2011.

Tabela 11: Níveis de condutividade nos três pontos amostrais

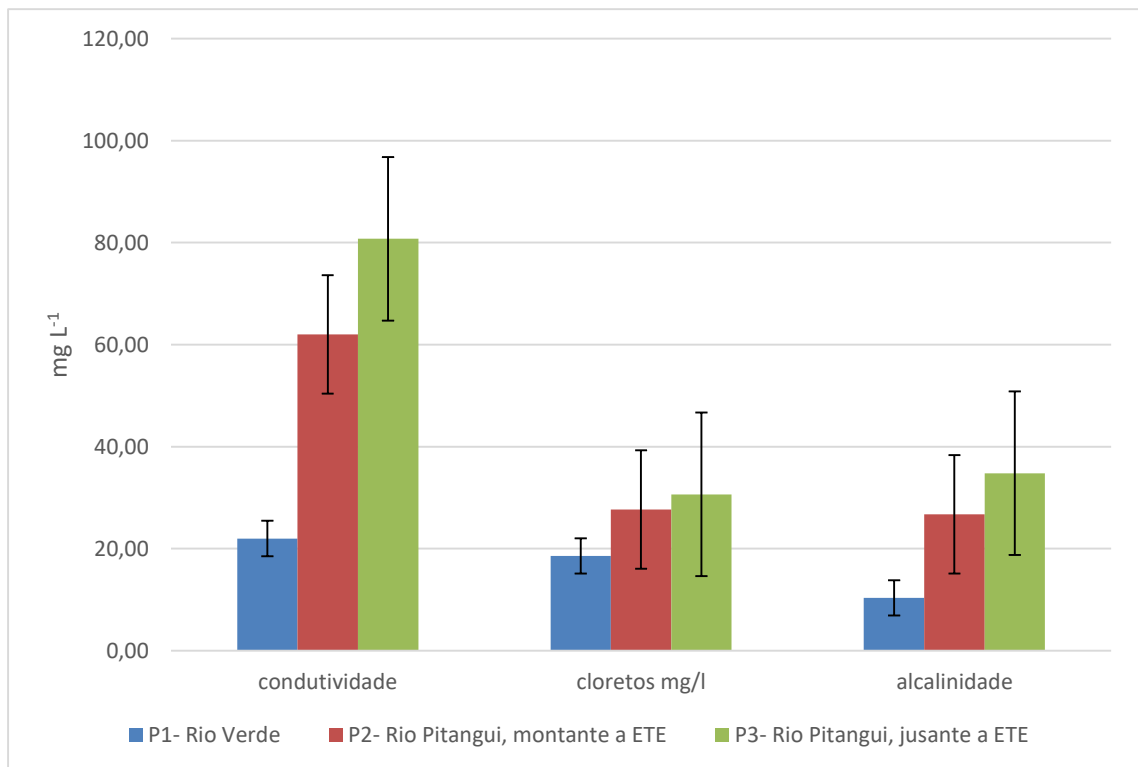
Pontos de coleta	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)								Média	DP
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6	Coleta 7	Coleta 8		
P1- Rio Verde Área urbana	22,0	48,0	25,0	18,0	18,0	17,0	15,0	13,0	22,0	11
P2- Rio Verde montante a ETE	53,0	91,0	59,0	57,0	68,0	58,0	50,0	60,0	62,0	12
P3- Rio Verde jusante a ETE	65,0	113,0	86,0	103,0	91,0	88,0	50,0	50,0	81	22

Fonte: O Autor

Os níveis de alcalinidade total também foram superiores para o Rio Verde, em P3 a jusante da ETE, com valores superiores a 30,0 mg CaCO₃ L⁻¹. Devido a sua localização, esse ponto de coleta sofre a influência do processo de tratamento que ocorre na ETE, através do sistema anaeróbio, no qual há a necessidade de elevada alcalinidade, entre 1000 e 5000 mg L⁻¹ em CaCO₃, para produzir efeito tampão, e impedir queda brusca de pH em caso de desequilíbrio (PIVELI, 2016). Nesse sentido, observa-se uma elevação nos índices da alcalinidade em P3, se comparado com os outros pontos (Figura 20).

Níveis mais elevados para este parâmetro podem ser atribuídos a inúmeras fontes, dentre elas o descarte de águas residuais tratadas e/ou não tratadas para corpos aquáticos (VERBANCK *et al*, 1994; TCHOBANOGLIOUS e BURTON, 1991). Além disso, valores mais elevados de alcalinidade também decorrem da decomposição de nutrientes e substratos orgânicos, sob condições anaeróbias (ABRIL e FRANKIGNOULLE, 2001).

Figura 20: Valores médios de condutividade, alcalinidade total e cloreto dissolvido obtidos durante as 8 coletas realizadas



Fonte: O Autor

A alcalinidade total também apresentou-se comparativamente elevada para as amostras coletadas em P2, com média de $27 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ($\pm 2,0$) com valor mínimo de $23 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e máximo de $30 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$.

Quanto ao parâmetro cloreto dissolvido (Figura 21), a Portaria nº 1.469/00 do Ministério da Saúde que disponibiliza a norma sobre qualidade da água para consumo humano estabelece em 250 mg L^{-1} a concentração máxima de cloreto dissolvido para que a água esteja em conformidade com o padrão de consumo. Assim, está restrita à potabilidade, ao sabor conferido pela presença dos íons cloreto. No caso da relação entre cloreto dissolvido e o aporte de esgotos sanitários ou efluentes, as concentrações de cloreto encontradas nos locais de amostragem devem ser comparativas entre os pontos. Neste trabalho, o valor mais elevado igual a 125 mg L^{-1} foi encontrado na última coleta no ponto P2.

12.4 Fósforo Total

O fósforo ocorre em água residuais e naturais principalmente na forma de fosfatos, que inclui ortofosfatos, fosfatos condensados, e fosfatos organicamente condensados, podendo ocorrer em solução, em partículas ou detritos nos organismos aquáticos (FONSECA, 2014).

Naturalmente o fósforo tem sua origem nos sistemas aquáticos através da dissolução de rochas e da decomposição da matéria orgânica, por outro lado, as fontes artificiais de fosfato incluem esgotos domésticos, esgotos industriais e fertilizantes agrícolas, além do material particulado de origem industrial e agrícola.

A resolução CONAMA 357 (2005), estabelece o limite de $0,050 \text{ mg L}^{-1}$ como máxima concentração de fósforo total (PT) permitida para rios Classe 2, em ambientes intermediários, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, como é o caso dos rios em estudo. Na tabela 15, estão relacionados os valores encontrados para os três pontos de coleta, na qual observa-se que em todos os pontos os valores para o PT estão acima do limite aceitável. Nos pontos P1 e P2, as principais fontes de fósforo são provavelmente o esgoto doméstico não tratado e também, em pontos específicos das margens, a drenagem de áreas agrícolas, enquanto que em P3, relaciona-se ao efluente da ETE.

Os teores de nutrientes inorgânicos dissolvidos como fósforo e nitrogênio representam o suprimento necessário à produção primária em ecossistemas aquáticos. O aumento da disponibilidade de nutrientes inorgânicos dissolvidos (principalmente através do lançamento de esgotos domésticos e efluentes industriais) tem como consequência direta, o incremento da biomassa de certos tipos de algas e de macrófitas aquáticas, o que contribui com a degradação da qualidade da água pela redução do oxigênio dissolvido (LIMA *et al.*, 2005).

As concentrações de fósforo no ponto P1, foram em média de 0,6 mg L⁻¹, com o índice mais baixo na última coleta, concentração de 0,31 mg L⁻¹. Para o ponto P2, a montante da ETE, a concentração de PT média foi de 0,7 mg L⁻¹, sendo a menor concentração também na coleta 8. Destaque-se o ponto a jusante da ETE onde a concentração média foi de 1,2 mg L⁻¹, valor 2400 vezes maior ao limite máximo permitido pela legislação vigente.

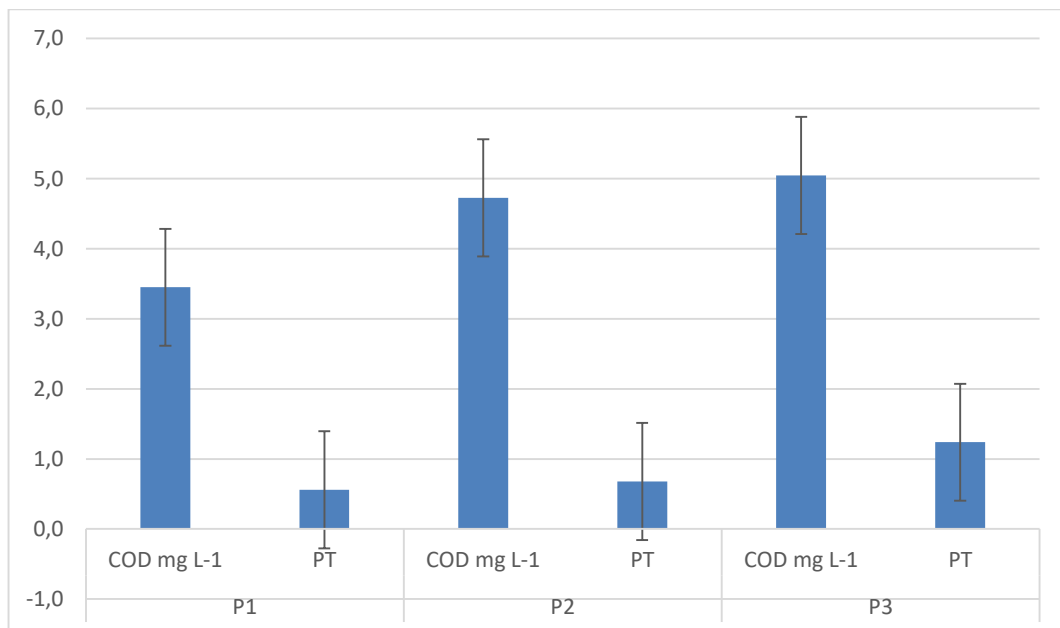
Tabela 12 Concentrações de Fósforo Total obtidas em 8 coletas

	P1- Rio Verde Área urbana	P2- Rio Verde Montante a ETE	P3- Rio Verde Jusante a ETE
Coleta 1	0,59	0,50	1,18
Coleta 2	0,62	0,64	1,20
Coleta 3	0,54	0,61	1,02
Coleta 4	0,55	0,80	1,61
Coleta 5	0,59	0,50	1,18
Coleta 6	0,71	0,65	1,71
Coleta 7	0,56	1,26	1,25
Coleta 8	0,31	0,46	0,76
MÉDIA	0,6	0,7	1,2
DP	0,1	0,3	0,3

Fonte: O Autor

As concentrações de PT e COD dos pontos amostrais podem ser relacionadas, pois ambos os parâmetros indicam a presença de matéria orgânica e aumentam significativamente e proporcionalmente com relação aos pontos, P1, P2 e P3, conforme observado na figura 21.

Figura 21: Relação entre PT e COD, nos pontos amostrais



Fonte: O Autor

Através dos resultados dos diversos parâmetros físico-químicos avaliados, e também pela observação *in situ* durante as coletas, pode-se afirmar que a qualidade da água do Rio Verde vem sendo comprometida devido a fatores relacionados à falta de proteção das áreas em seu entorno, à ocupação inadequada destas áreas por assentamentos humanos; ao aporte de efluentes principalmente domésticos lançados *in natura* ou de sistemas inadequados de tratamentos de esgoto; e devido à elevada concentração de cargas poluentes e resíduos tanto de origem urbana como rural. Assim, a pesquisa por um indicador de esgoto doméstico, representado neste trabalho pela cafeína, se mostra como uma importante ferramenta facilitadora para a obtenção do diagnóstico de impactação.

13. Determinação da cafeína nos pontos amostrais

Para a determinação da cafeína nas amostras coletadas no Rio Verde, empregou-se CLAE com detector UV-Vis, conforme anteriormente descrito. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata, e após SPE. Além das amostras de água superficial obtidas nos três pontos de coleta já descritos, duas amostras de efluente tratado coletado dentro da ETE, também foram analisadas. Foram duas coletas de efluente tratado, nos dias 23 e 30 de maio de 2016.

Visto os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados nesta pesquisa previa-se encontrar cafeína em todos os pontos de coleta, principalmente nos pontos P2 e P3 no Rio Verde.

As análises cromatográficas permitiram detectar e quantificar a cafeína a montante (P2) e a jusante da ETE (P3) (tabela 16), com variações consideráveis nas concentrações se comparados com o valor encontrado no efluente tratado da ETE. No ponto P1 a cafeína foi detectada, mas não quantificada.

As análises cromatográficas permitiram detectar e quantificar a cafeína a montante(P2) e a jusante da ETE(P3) (tabela 13), com variações consideráveis nas concentrações se comparados com o valor encontrado no efluente tratado da ETE, no ponto P1 a cafeína foi detectada e quantificada.

Tabela 13: Concentrações de cafeína ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos pontos P2 e P3

	Concentração de cafeína ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Data da coleta	P2- Rio Verde Montante a ETE	P3- Rio Verde Jusante a ETE
Coleta 1	05 de abril	70,7	149,6
Coleta 2	11 de abril	48,6	78,2
Coleta 3	18 de abril	56,7	74,2
Coleta 4	25 de abril	52,4	52,4
Coleta 5	02 de maio	149	170,2
Coleta 6	09 de maio	75,4	128,0
Coleta 7	16 de maio	299,1	270,6
Coleta 8	23 de maio	217,0	227,8

FONTE: o autor

Em relatos na literatura, podem-se verificar valores semelhantes que corroboram as concentrações encontradas neste trabalho. Montagner e Jardim (2011) encontraram em mananciais de Campinas, concentrações de cafeína de até $127 \mu\text{g L}^{-1}$; também Frohener e colaboradores (2010) em pesquisa realizada em mananciais de Curitiba, concentrações máximas de $753 \mu\text{g L}^{-1}$ e Gonçalves (2008) concentrações máximas de $47 \mu\text{g L}^{-1}$ em pesquisa realizada em Teresópolis, no Rio de Janeiro.

Neste trabalho, as concentrações de cafeína encontradas no Rio Verde, em P2 (montante da ETE), estiveram entre $48,6$ a $299,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e para P3 (jusante da ETE) entre $52,4$ e $270,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Ainda que os valores mínimos e máximos sejam semelhantes, P2 apresentou concentração média de $121,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e P3 concentração média de $144,0 \mu\text{g L}^{-1}$. O descarte de efluente da ETE enriquece a concentração das águas do Rio Verde com a substância cafeína. As concentrações de cafeína foram superiores para P3 em sete das coletas realizadas, e praticamente equivalentes ao dobro das concentrações de P2, em algumas delas.

Sendo a cafeína considerada um indicador do impacto por esgoto doméstico, pode-se verificar que alguns parâmetros físico-químicos avaliados, confirmam essa relação. Assim, fósforo total cujo limite segundo a legislação deve ser $0,050 \text{ mg L}^{-1}$, esteve presente em concentrações superiores a 1 mg L^{-1} em praticamente todas as amostras de P3, e também para P2 foram observadas concentrações constantemente acima de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$, com máxima superior a 1 mg L^{-1} .

Também os valores encontrados para DBO5 que foram superiores aos limites para rio Classe 2, de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, permitindo classificar o Rio Verde (P2 e P3) como Classe 3, com DBO de até $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$.

Destaque-se ainda a DQO comparativamente mais elevada para os pontos P2 e P3 e concentrações de COD com valores de até $9,6 \text{ mg L}^{-1}$ em P3 confirmando uma vez mais o enriquecimento da água com matéria orgânica após o descarte do efluente da ETE.

13.1 Análise do Efluente da ETE

No intuito de observar a concentração da cafeína como um perfil de comparação da mesma com as concentrações encontradas nas águas superficiais, foram realizadas duas coletas de efluente tratado.

Observa-se a presença de cafeína no efluente tratado da ETE Rio Verde, sendo a menor concentração de $488,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e a maior de $617,4 \mu\text{g L}^{-1}$ na coleta realizada no dia 30 de maio (Tabela 14). Ao comparar as médias destes dois pontos com as médias das concentrações de cafeína nas amostras de águas superficiais após a ETE, observa-se que ocorre uma diluição nas concentrações, confirmando que no processo de tratamento de esgoto desta ETE a cafeína não é retida ou eliminada, e sua concentração no rio que recebe o efluente dependerá principalmente da vazão do rio.

Tabela 14: Concentração da cafeína no efluente tratado

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	23/mai	30/mai
1ª injeção	488,5	552,9
2ª injeção	493,8	583,6
3ª injeção	490,2	617,4
Média	490,8	584,6
DP	2,7	32,3

FONTE: o autor

A Legislação que rege a emissão de efluentes no Brasil está baseada fundamentalmente na Resolução CONAMA nº 430/2011, segundo qual, a empresa responsável pela rede coletora e pelo tratamento do esgoto (no caso de Ponta Grossa, a SANEPAR), deve manter controle sobre a qualidade dos efluentes produzidos, realizando automonitoramento. Conforme o Art. 3º “Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições padrões e exigências dispostos na mesma Resolução e em outras normas aplicáveis” (BRASIL, 2011).

Entretanto, inúmeras substâncias, principalmente aquelas de preocupação emergente, não estão contempladas em normas ou legislações, e assim não são monitoradas. Por outro lado, o aporte de matéria orgânica e fósforo pode ser confirmado neste trabalho, pois as concentrações de fósforo total e de DBO5 estão contemplados na legislação.

Ainda que existam laudos do automonitoramento, indicando que o efluente está em condições de aporte, há um importante aspecto a ser considerado: a vazão de

efluente gerado na ETE. Esta vazão não pode ser superior ao volume e a vazão do rio que o recebe. De acordo com a Resolução CONAMA N° 430/2011, Art 12:

“O lançamento de efluentes em corpos de água, com exceção daqueles enquadrados na classe especial (onde não é permitido o lançamento), não poderá exceder as condições e padrões de qualidade de água estabelecidos para as respectivas classes, nas condições da vazão de referência ou volume disponível, além de atender outras exigências aplicáveis”.

Ou seja, no caso do Rio Verde, após o recebimento do efluente da ETE, há perda na qualidade hídrica conforme pode-se acompanhar através dos parâmetros físico-químicos, excedendo as condições estabelecidas na legislação. A presença da cafeína é um indicativo de que outras substâncias com origem no esgoto urbano podem também estar presentes, ainda que em níveis traço, mas com consequências para o ambiente e para a saúde ainda não esclarecidas.

14. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa, que teve como finalidade detecção e quantificação da cafeína em águas superficiais como indicador de contaminação por esgoto doméstico, efetivada no município de Ponta Grossa, sendo inédita para o Rio Verde e região.

A detecção e a quantificação da cafeína através das técnicas de extração em fase sólida (SPE) e da cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV foram importantes na comparação entre os pontos P2 e P3, ou seja, avaliando o impacto da ETE no Rio Verde, fato que se confirma através dos resultados obtidos.

A partir dos resultados foi possível associar a presença da cafeína em águas superficiais como indicador de contaminação por esgoto doméstico. Os dados obtidos quanto aos parâmetros físico-químicos trouxeram um cenário de impactação nos três pontos de coleta, associado ao aporte de esgoto bruto e do efluente tratado da ETE. Parâmetros associados ao impacto por esgoto doméstico como fósforo total, e índices associados à presença de matéria orgânica como DQO, DBO5 e COD permitiram comparar os pontos de coletas, e relacionar com a concentração de cafeína, confirmando essa substância como indicador de contaminação.

É importante destacar que não houve detecção e quantificação da cafeína em P1, no rio Verde em área urbana, provavelmente porque a cafeína esteve abaixo do limite de quantificação da curva analítica estabelecida nesta pesquisa.

A cafeína como indicador de contaminação ambiental por aporte de esgoto doméstico é uma nova ferramenta de análise, ainda pouco explorada, principalmente, em função da expectativa de que os níveis de concentração em matrizes ambientais sejam reduzidos. Portanto, vale ressaltar a importância de novas pesquisas para aperfeiçoamento de metodologias, buscando estabelecer melhores limites para quantificação da cafeína nessas matrizes.

15 REFERÊNCIAS

ABIC, Associação Brasileira da Indústria de Café. **Estatísticas: Indicadores da Indústria de café do Brasil.** *In:* Portal da Associação Brasileira da Indústria de café. 2015. Disponível em <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48>>. Acesso em 23 dez.de 2015.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Requisitos Gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**, 2ª Ed., Rio de Janeiro, 2005.

AFONSO, J. **Contaminante Emergentes.** *Revista de Química Industrial*, Ano 81 nº 738, 1º trimestre de 2013, ISSN: 0370694X.

ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. **Legislação. Resolução 899 de 29 de maio de 2003: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/377_99.htm> Acesso: 10 jan. 2016.

APHA- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20 ed. Washington: APHA, 1998, 937p.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO. M. C.; E ANDRADE, J. B. **Validation of chromatographic Methods na experimente using HPLC and Green Chemisry em Methyxanthines determination**, *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 9, 2476-2481, 2009.

AQUINO, Sérgio Francisco de; BRANDT, Emanuel Manfred Freire; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. **Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura.** *Eng. Sanit. Ambient.*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 187-204, Sept. 2013.

ARIAS, D. V, **Contaminantes emergentes, seus efeitos no meio ambiente e desafios para novos mecanismos de purificação de água.** BE_310 CIÊNCIAS DO AMBIENTE – UNICAMP, ESTUDOS. Disponível em< http://www.ib.unicamp.br/dep_biologia_animal/BE310>. Acesso em 12 abr. 2016.

AYDIN, E.; TALINLI, I. **Analysis, occurrence and fate commonly used pharmaceuticals and hormones in the buyukcekmece Watershed**, Turkey. *Chemosphere*, v.90, p. 2004-2012, 2013.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S.; **Química Analítica Quantitativa Elementar**, Ed. Edgard Blücher Ltda, 3ª. ed., 1998, p. 154-190.

BACCI, D. de L. C.; PATACA, E. M. Educação para a água. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 211-226, 2008.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844p.

BALDO, Wellington Silva; ZEH, Kaethlin Katiane; MOREIRA, Diogo Augusto. **AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE QUALIDADE DA ÁGUA (IQA), nas Bacias Hidrográficas dos Rios Cubatão e Cachoeira em 2015**, Monitoramento Ambiental, Comitê de Gerenciamento das Bacias Hidrográficas dos Rios Cubatão e Cachoeira, Joinville, SC, 2015.

BANNAGA, S. H.I.; **The need for UN climate change policy reformation**, *Future Cities and Environment* (2016) 2:4 DOI 10.1186/s40984-016-0015-1

BAKER, D. R.; KASPRZYK-HORDERN, B. **Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionization tandem mass spectrometry**. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 1620-1631, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.060>

BARBETTA, Pedro Alberto; REIS, Marcelo Menezes; BORNIA, Antonio Cezar. **Estatística: para cursos de engenharia e informática**. 3ª ed, São Paulo: Atlas, 2004.

BARROS, C. M. **Validação de método analítico, Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.

BARRIONUEVO, Wilma Regina; LANCAS, Fernando Mauro. **Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 172-175, Apr. 2001 .

BARCELÓ, Damià; LÓPEZ, María J. **Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes**. Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente, Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC, Barcelona, 2008.

BARCELÓ, Damià. **Occurrence, handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment. A review**. *Analyst*, v. 116, n. 7, p. 681-689, 1991.

BARCELÓ, Damià. **Emerging pollutants in water analysis**. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p. xiv-xvi, 2003.

BARONE, J.J. & ROBERTS, H. **Caffeine consumption**. *Food and Chemical Toxicology*, Elmsford, v.34, n.1, p. 119-129, 1996.

BARBIER, A, et al. **Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis**, *Anal Bioanal Chem* 406: 1259, 2014.

BATISTA, A. A; MEIRELES. A. C. M; de ANDRADE E. M.; ARAÚJO NETO, J. R.; PALÁCIO H. A. Q. **Relação entre nitrogênio total e fósforo total nas águas**

superficiais do açude Orós-CE., IV WINOTEC, Whorkshop Internacional de Inovações tecnológicas na Irrigação, 28 a 30 de maio de 2012, Fortaleza-CE-Brasil.

BASSIT, R. A. **Cafeína**. Portal São Francisco. Disponível em:<<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/cafeina/cafeina.php>>. Acesso em Jan. de 2016.

BONFILIO, R., CAZEDEY, C. L.ARAUJO, M. B. de, SALGADO, R. N. **Analytical Validation of Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis: A Practical Approach**, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42:87–100, 2012.

BRADLEY, P. M.; BARBER, L. B.; KOLPIN, D. W.; MCMAHON, P. B.; CHAPELLE, F.H. **Biotransformation of Caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as Wastewater indicators**, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, No. 6, pp. 1116–1121, 2007. doi:10.1897/06-483R.1.

BRASIL. **Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981**. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938compilada.htm> Acesso em 17 de out. de 2015.

BRASIL, CNRH, Conselho Nacional de Recursos Hídricos. Conjuntos de normas legais: recursos hidricos / Ministério do Meio Ambiente. 8o ed. Brasília: MMA, 2014. 684 p. **Resolução nº.91 de novembro de 2008**. Disponível em:<<http://www.cnrh.gov.br/>>. Acesso em 17 de out de 2015.

BRASIL, **Portaria nº 1.469 - GM, de 29 de dezembro de 2000**, Ministério da Saúde. Aprova a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. Disponível em: <www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_1469-00.pdf> Acesso em 17 de mai. de 2016.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2011.

BRAVO, J.E, **Optimización de Metodologías Analíticas para la Determinación de ontaminates Emergentes em Aguas de Abastecimento y Residuales**, Tese de Doutorado, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, 2012.

BRITO, N. JUNIOR, OZ.P., POLESE. L., RIBEIRO, M. **Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão**. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUERGE, I. J.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D.; DUSER, H. R. **Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters**.

Environmental Science Technology, v. 37, p. 691-700, 2003. DOI: 10.1021/es020125z.

BUERGE, I. J.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D.; DUSER, H. R, **Combined Sewer Overflows to Surface Waters Detected by the Anthropogenic Marker Caffeine**. *Environmental science & technology*, vol: 40, p. 4096 - 4102, 2006.

CANELA, [et al.]. (Editor). – **CAFEÍNA EM ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO NO BRASIL**, Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), São Carlos: Editora Cubo, 2014.

CASTRO, E. S. C. de. **Avaliação da Qualidade da água do Arroio Santa Luísa através de parâmetros aquáticos e da determinação da cafeína**. Trabalho de Conclusão de Curso. UEPG, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Bacharelado em Química, 2015.

CETESBE, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, SP, **Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem**, São Paulo, SP, p. 44, 2009

CLAUSEN, D. N.; OLIVEIRA, F. M.; CASARIN, J.; SARTORI, E. R.; TARLEY, C. R. T **Development of HPLC Method for Quantification of Orphenadrine, Paracetamol, and Caffeine in Pharmaceutical Formulations**. *Rev. Virtual Quim.* Vol 7, nº. 6, p.2066-2079, 2015.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Disponível em: http://www.legislacao.mutua.com.br/pdf/diversos_normativos/conama/2011_CONAMA_RES_430.pdf. > Acesso em: 07 dez. 2015

CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J.; SKOOG D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

CONLEY, J. M.; SYMES, S. J.; SCHORR, M. S.; RICHARDS, S. M. **Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin**. *Chemosphere*, v.73, p.1178-1187, 2008.

COSTANTIN, A. M.; *et al.* **Análise de Qualidade da água de quatro pontos do Rio taquari próximos à barragem/eclusa de Bom Retiro do Sul, Rio Grande do Sul**, *Revista Destaques Acadêmicos*, CETEC/UNIVATES VOL. 6, N. 4, 2014.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 452p. 2006.

COX, B. A. **A review of dissolved oxygen modelling techniques for lowland rivers**, *Science of The Total Environment*, Vol. 314–316, October 2003, p. 303–334.

CZAPLICKI, S. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds, INTECH 2004 Dr. Dean Martin (Ed.), Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/chromatography-in-bioactivity-analysis-of-compounds>>. Acesso em Jan de 2016.

DUTRA, F. L. G. **Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenada em sistemas de estacionamento natural e acelerado**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Curitiba, Pr

DANESHVAR, A.; ABOULFADL, K.; VIGLINO, L.; BROSEUS, R.; SAUVÉ, S.; MADOUX-HUMERY, A.; WEYHENMEYER, G. A.; PRÉVOST, M. **Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region**. Chemosphere, v. 88, p. 131-139, 2012. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.03.016.

EPA, United States Environmental Protection Agency, **Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products** Disponível em: < <http://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>> Acesso em 22 dez. 15.

EPA, United States Environmental Protection Agency, 2008. **White Paper, aquatic Life Criteria for contaminants of emergings concern, Parte I**. Disponível em: < <http://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>> Acesso em 22 dez. 15.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Disponível em: < <http://www.epa.gov/esd/bios/pdf/contaminants-biosolids2.pdf>>. Acesso em Out.de 2015.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência/FINEP, 1988, p. 575

FALONE, S. Z. **Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17'alfa'-metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-09042008-133314/>>. Acesso em: 11 de jan. de 2016.

FARAH, A. **Distribuição nos grãos, importância na qualidade da bebida e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café**, Rio de Janeiro, Brasil. 2004. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) - Instituto de Química, CT, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2004.

FERREIRA AP, De LOURDES C, Da CUNHA N. **Anthropic pollution in aquatic environment: development of a caffeine indicator**. *Int J Environ Health Res*. 2005; 15(4):p. 303– 311. DOI: 10.1080/09603120500155898.

FERREIRA, AP., **Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems.** *Cadernos de Saude Pública*, vol. 21, no. 6, p. 1884-1892.. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2005000600038>>. Acesso em dez. de 2015.

FROEHNER, S., MACHADO, KS. FALCÃO, F., MONNICH, C. and BESSA, M., 2011. **Inputs of domestic and industrial sewage in upper Iguassu, Brazil, identified by emerging compounds.** *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 215, no. 1-4, p. 251-259. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11270-010-0475-0>>. Acesso em dez. 2015. DOI: 10.1007/s11270-010-0475-0

FROEHNER, S., SOUZA, DB. MACHADO, KS. and ROSA, EC., 2010. **Tracking anthropogenic inputs in Barigui River, Brazil using biomarkers.** *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 210, no. 1-4, p. 33-41. DOI: 10.1007/s11270-009-0220-8.

FERNÁNDEZ, C.; GONZÁLEZ-DONCEL, M.; PRO, J.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. v. **Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-Jarama-Tajo River system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization;** *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 543-551, 2010. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.009

FOCAZIO, M. J.; KOLPIN, D. W.; BARNES, K. K.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; THURMAN, M. E. **A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources.** *Science of the Total Environment*, v. 402, p. 201216, 2008. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.02.021

FONSECA, R. **Ocorrência e determinação de Triclosan em águas de abastecimento na Bacia do Rio Pitangui.** 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Aplicada, UEPG, Ponta Grossa, 2014. Disponível em: <uepg.com.br>. Acesso em: 05 de jun. 2015.

FROEHNER, S., SOUZA, D. B.; MACHADO, K. S.; ROSA, E. C. **Tracking Anthropogenic Inputs in Barigui River, Brazil Using Biomarkers.** *Water Air and Soil Pollution*. v. 210, p. 33-41, 2010. DOI: 10.1007/s11270-009-0220-8.

GARCIAS; C. M, SANCHES. A. M. **Vulnerabilidades sócioambientais e as disponibilidades hídricas urbanas: levantamento teórico-conceitual e análise aplicada à região metropolitana de Curitiba – PR.** *Risco: Revista de Pesquisa em Arquitetura e Urbanismo (Online)*, EESC-USP. 10, 2, 2009. DOI: 10.11606/issn.1984-4506.v0i10p96-111

GARDINALI, P.R. & ZHAO, X. **Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatograph – atmospheric pressure chemical ionization – mass spectrometry (LCAPCI-MS).** *Environment International*, 2002, 28:521-528.

GREENWOOD, R. MILLS, G.A. ROIG B. **Introduction to emerging tools and their use in water monitoring,** *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 4, 200.

GEALH, A. M.; MELO, M. S. de; MORO, R. S. **Pitangui, rio de contrastes, seus lugares, seus peixes, sua gente**. Ponta Grossa: Ed. UEPG, 2010.

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

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C. & SCHENKEL, E. P. **Influence of the extraction methodology on the methylxanthines content of maté (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae)**, *Química Nova*. São Paulo, v.30, n.2, Mar./Apr. 2007.

GOMES, p. C. F. L.; BARNES, B. B.; SANTOS-NETO, A.J.; LANCAS, F. M.; SNOW, N. H. **Determination of steroids, caffeine and methylparaben in water using solid phase microextraction-comprehensive two dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry**. *Journal Chromatography A*, v. 1299, p. 126-130, 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.05.023.

GONZALEZ, C. et al. **Validation procedure for existing and emerging screening methods**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 315-322, 2007, DOI: 10.1016/j.trac.2007.01.003

GONÇALVES, E. S., **O uso da cafeína como indicador de contaminação por esgoto doméstico em águas superficiais**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em geociência, 2008.

GUEDES, V.; **Caracterização físico-química do lodo gerado num sistema anaeróbico de tratamento de efluentes de origem residencial**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Aplicada, Uepg, Ponta Grossa, 2013. Disponível em: <uepg.com.br>. Acesso em: 05-de mai. 2016.

HAYES R. et al., **Review Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography**. *Journal. Chromatogr. A* 1357 (2014) 36–52. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.010

HECKMAN, M. A. WEIL, J. E MEJIA, E. G. **Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters**. *Journal of food science*, Institute of Food Technologists Vol. 75, Nr. 3, 2010,. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01561.

HIGDON, J. V. & BALZ. F. **Coffee and Health: A Review of Recent. Human Research**, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:2, 101-123, DOI: 10.1080/10408390500400009, 2006 Disponível Em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507475>> . Acesso em: 29-de dez. 2015. DOI:10.1080/10408390500400009

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D.L. **Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent**. *Life Sciences*, 1977, v. 20, n. 2, p. 337-341. DOI: 10.1016/0024-3205(77)90329-0

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. **Ultrapformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters.** Analytical Chemistry, v. 79, p. 3821-3829, 2007. DOI: 10.1021/ac062370x

HUGEL H. M, YU N., JACKSON N; **The Effects of Coffee Consumption on Cognition and Dementia Diseases.** J Gerontol Geriatr Res 4:233. doi:10.4172/2167-7182.1000233, 2015.

KOMORI, K.; SUZUKI, Y.; MINAMIYAMA, M. **Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk.** Environmental Monitoring Assessment, v. 185, p. 4529-4536, 2013. DOI: 10.1007/s10661-012-2886-4.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 01 de março de 2003. Disponível em:< www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em jun. 2015.

IFIC REVIEW, International Food Information Council Foundation. **Caffeine & Health: Clarifying The Controversies.** Food Insight. Disponível em:< http://www.foodinsight.org/IFIC_Review_Caffeine_and_Health_Clarifying_the_Controversies_> Acesso em mai. de 2015.

JARDIM, I., **Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas** Scientia Chromatographica Vol.2, N°1, 13-25, 2010

LAMPARELLI, M. C. **Grau de trofia d'água do estado de São Paulo: Avaliação dos Métodos de Monitoramento.** 2004. 191 f. Tese (Doutorado em Ecossistemas Terrestre e Aquáticos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LANÇAS, F.M; **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, São Carlos: Editora RIMA, 2004, 62p.

LEITE, F. **Validação de análise química- Campinas**, SP: Editora Átomo, 5ª Edição. 2008.

LEUNG, H. W., JIN, L., WEI, S., TSUI, M. M. P., ZHOU, B., JIAO, L., LAM, P. K. S. (2013). **Pharmaceuticals in Tap Water: Human Health Risk Assessment and Proposed Monitoring Framework in China.** Environmental Health Perspectives, 121(7), 839–846 DOI:10.1289/ehp.1206244.

LIBANÊO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água.** 2ª ed. Campinas: Átomo, 2005

LIMA, J. de P, FARAH. P., **Comparação dos teores de metil xantinas no café e em outras bebidas estimulante comumente consumidas no Brasil**, 2013, VIII

Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 25 a 28 de Novembro de 2013, Salvador – BA. Disponível em:< www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/3412>. Acesso em out. 2015.

LINDEN, R et al. **Caffeine as an indicator of human fecal contamination in the Sinos River: a preliminary study.** Braz. J. Biol., São Carlos v. 75, n. 2, supl. p. 81 - 84, May 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-9842015000300014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 Jan. 2016. DOI: 10.1590/1519-6984.0513.

LOOS, R.; WOLLGAST, J.; HUBER, T.; HANKE, G. **Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy.** Analytical Bioanalytical Chemistry, v. 387, p. 1469-1478, 2007. DOI: 10.1007/s00216-006-1036-7.

LOOS, R.; LOCORO, G.; CONTINI, S. **Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPELC-MS(2) analysis.** Water Research, v. 44, p. 2325-2335, 2010. DOI: 10.1016/j.watres.2009.12.035

LOPES, M. R. S, MARTINEZ, S., T., CHAVES, V. C., ROCHA, A, S, R., AMARANTE, L. **Determinação por HPLC de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex paraguariensis*.** Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 954-956, jul. 2007

MA, R.; WANG, B.; LU, S.; ZHANG, Y., YINA, L.; HUANG, J.; DENG, S.; WANG, Y.; YU, G.; **Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk.** Science of the Total Environment, 2016, p. 268–275. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.053

MACENO M. M. C; MACHADO, K. S; VELOZO, T. G.; Maria Carolina Vieira da ROCHA, M. C. V. FROEHNER, S. J; **Avaliação da qualidade da água do Aquífero Guabiroba em uma região central da cidade de Curitiba, Paraná - Brasil,** I Congresso Internacional de Meio Ambiente Subterrâneo, I International Congresso on Subsurface Environment, I Congresso Internacional de Medio Ambiente Subterrâneo. 2009

MADAL, A. **Farmacologia da Cafeína,** NEWS MEDICAL, LIFE SCIENCES & MEDICINE, 2016. Disponível em:< [http://www.news-medical.net/health/Caffeine-Pharmacology-\(Portuguese\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Caffeine-Pharmacology-(Portuguese).aspx)>. Acesso em jul. de 2016.

MANSOR, M. T. C.; **Potencial de poluição de águas superficiais por fontes não pontuais de fósforo na Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Pinhal, Limeira-SP-** Campinas, SP: Filho. Tese (Doutorado), 2005,189 f. - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, 2005.

MARIA, C.; MOREIRA, R. **Cafeína: revisão sobre métodos de análise** *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 99-105, 2007.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. **High performance liquid chromatography: a short review**. *Journal of Global Pharma Technology*, v. 2, p. 2226, 2010.

MATAMOROS V, ARIAS CA, NGUYEN LX, SALVADÓ V, BRIX H., **Occurrence and behavior of emerging contaminants in surface water and a restored wetland**. *Chemosphere*. 2012 Volume 88, Issue 9, p. 1083–1089. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.048

MATONGO, S.; BIRUNGI G.; MOODLEY, B.; NDUNGU, P.; **Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa**, *Chemosphere* , 2015, p. 133–140, DOI:10.1016/j.chemosphere.2015.03.093.

MANIGLIA, E. (organizadora). **Direito, políticas públicas e sustentabilidade**. São Paulo: Cultura Acadêmica, Editora UNESP, 2011. 269 p.

MELO, A.C.; DIAS, V. **Fósforo: o vilão dos rios**. *Jornal da USP*, São Paulo, ano 17, nº 596, maio de 2002.

MELO, Silene Alessandra Santos et al. **Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000100034&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100034>.

MUSOLFF, A.; LESCHIK, S.; MÖDER, M.; STRAUCH, G.; REINSTORF, F.; SCHIRMER, M. **Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters**. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 3069-3077, 2009. DOI: DOI: 10.1016/j.envpol.2009.05.037

MONTAGNER, Cassiana C.; JARDIM, Wilson F. **Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil)**. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 22, n. 8, p. 1452-1462, Aug. 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532011000800008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 24 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000800008>.

MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A.; PASQUINI, C.; JARDIM, W. F. **Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source waters**. *Environmental Science: Processes & Impact*, no prelo, 2014, DOI: 10.1039/C4EM00058G

MOREIRA, B. J ; YOKOYA J. M. C. GAITANI C. M. **Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME): principles, innovations and biological applications.**, *Scientia Chromatographica* 2014; vol. 6, nº3, p. 186-204 DOI: 10.4322/sc.2015.005

MOHALLEM, D.F. et al, **Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos com frangos de corte**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 449-453, Apr. 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352008000200026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000200026>.

MOURA, C. NOGUEIRA, B. A, SILVA, R. C., GUZ, R., OLDONI, T.L. C. **Determinação de cafeína em chá Preto (*Camellia sinensis*) por Cromatografia Líquida de Alta eficiência**, Synergismus s cyentifica UTFPR, Pato Branco, Pr, vol 10, ° 1. 2015

MOURA, J. F.; ROGES, E. M.; SOUZA; R. L.; SICILIANO, S.; RODRIGUES, D. P. **Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World**. Marine Environment and Public Health. INTECH, Cap. 11, 2012. p.263-284. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biodiversity-conservation-andutilization-in-a-diverse-world/marine-environment-and-public-health#article-front>>. Acesso em 02 de maio de 2016. DOI: 10.5772/3330

NANJUNDAIAH, S.; KRISHNA, H.; BHATT, P.; **Fluorescence Based Turn-on Probe for the Determination of Caffeine Using Europium-Tetracycline as Energy Transfer Complex**, Journal of: 2016, vol: 26, p: 1115 -1121. DOI: 10.1007/s10895-016-1803-6

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**. V. 25, p. 772-776, 2002

OECD, ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, **New and Emerging Water Pollutants arising from Agriculture**., Environment Department, University of York, United Kingdom, p. 49, 2012

ORLANDO, R. M., CORDEIRO, D. D., MATHIAS, A. E. B., REZENDE, K. R., Gil, E. S. **Pré-tratamento de amostras**. Vita et Sanitas, Trindade-Go, n. 03, jan.-dez./2009

PERONE, D., DONANGELO, M., FARAHET, A. **Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography**, Food Chemistry 110 (2008) 1030–1035, DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.012

PARAG *et al.* **A study of the variability of caffeine profile of processed black tea marketed in certainn regions of assam with reference to the caffeine contente of tender tea leaves and organic tea**. Intern ational Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, P: 90, 2012.

LEPOM P., BROWN, B. HANKE, G. LOOS, R., QUEVAUVILLER, P., WOLLGAST, J., **Needs for reliable analytical methods for monitoring chemical pollutants in surface water under the European Water Framework Directive**, Journal of Chromatography A, Volume 1216, Issue 3, 16 January 2009, Pages 302–315

PASQUINI, N. C.; **Monitoramento de fármacos no Ribeirão Quilombo, estado de São Paulo, BR**, Saúde Meio Ambient. v. 5, n. 1, p. 63-77, jan./jun. 2016

PAXÉUS, N.; SCHRÖDER, H. F. **Screening for nonregulated organic compounds in municipal wastewater in Göteborg**, Sweden, Water Science and Technology, v. 33, p. 9–15, 1996.

PEELER, K. A, OPSAHL, S.; CHANTON, J. P.; **Tracking Anthropogenic Inputs Using Caffeine, Indicator Bacteria, and Nutrients in Rural Freshwater and Urban Marine Systems**, ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY / VOL. 40, NO. 24, 2006.

PELLACANI, Christian Rodrigo. **Poluição das Águas Superficiais & responsabilidade civil**. Curitiba: Juruá, 2005. 138 p.

PETROVIC E BARCELÓ, **Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water**. *Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, c/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain*. 2011;

PIVELI, R. P., **Curso “Qualidade das águas e poluição: aspectos físico- químicos, Aula 6 características químicas das águas: pH, acidez, alcalinidade e dureza**. Disponível em < www.leb.esalq.usp.br/.../Fasciculo%206%20-%20Alcalinidade%20e%20Acidez.pdf> Acesso em 14 jul 2016.

POCINHO, M. **Estatística: Teoria e exercícios passo-a-passo, v.1, 2009**. Disponível em< <https://www.researchgate.net/publication/268150358>> Acesso em set. de 2015.

POMA, V.; MAMANI, V.; IÑIGUEZ, V. **Impact of urban contamination of the La Paz River basin on thermotolerant coliform density and occurrence of multiple antibiotic resistant enteric pathogens in river water, irrigated soil and fresh vegetables**. *SpringerPlus*, 5, 499, 2016. DOI:10.1186/s40064-016-2132-6

PONTA GROSSA. **Plano Diretor Participativo do Município de Ponta Grossa**, Apêndices: aspectos ambientais, 2014, Ponta Grossa-Pr

GONÇALO P. **Águas marinhas e estuarinas: métodos de amostragem e armazenamento**. *Ecologi@ 4*: 69-75 (2012)

QUEIROZ, S. N. COLLINS, C. H. JARDIM, I. C. S. F. **Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAMOS, E. C. **Educação ambiental: origem e perspectivas**. *Educ. rev.* [online]. 2001 n.18, pp. 201-218. ISSN 0104-4060.

RETNADHAS S., GUMMADI S. N., **Optimization of Process Conditions for Biotransformation of Caffeine to Theobromine using Induced Whole Cells of**

Pseudomonas sp, 2014, J Bioprocess Biotech 4: 178 doi: 10.4172/2155-9821.1000178.

REIS FILHO, R. W. et al, **Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos**, J. Braz. Soc. Ecotoxicol, v. 2, n. 3, 2007, 283-288.

RODRIGUEZ DEL REY, Z.; GRANEK, E. F.; SYLVESTER, S., **Occurrence and concentration of caffeine in Oregon coastal Waters**, Marine Pollution Bulletin 64 (2012) 1417–1424

RIBEIRO, F. A. de L et al. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. Quím. Nova, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000100029&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 19 jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000100029>.

RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Quím. Nova, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, Oct. 2004. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500017&lng=en&nrm=iso>. Access on 19 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.

RIBICKI, A. C. **Relação entre a matéria orgânica e biomoléculas presentes em cursos d'água que sofrem influência variada**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Aplicada, UEPG, Ponta Grossa, 2013. Disponível em: <uepg.com.br>. Acesso em: 05 de mar. 2016.

ROCA, M.F.de, SOBRINHO, J. L., NUNES, L.C.C, NETO, P.J. R. **Development and validation of analytical methods: an important steep in the medicines production**, Rev. Bras. Farm., 88(4): 177-180, 2007.

ROCHA, B. A.; JÚNIOR, F. B.; **CONTAMINANTES EMERGENTES (1º Capítulo): Bisfenol A e análogos**, Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP/USP), Edição Vol. 2, N. 1, 01 de Outubro de 2014, disponível em:< DOI: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2014.09.29.002>>. Acesso em 25 de maio de 2016.

RODRIGUES, L. S; SANTOS, J. C. P. dos; HEINECK, D. T.; GONÇALVES, D. F; ARAÚJO, P.C. de; PINTO, M. I. de S. **O Uso Indevido da Água como problema social: O caso do Rio Águas Claras do Município de Alvorada do Oeste/RO**. *Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC*, Florianópolis, SC, Julho, 2006.

RUBILAR, C. S e UEDA A. C. **Análise físico-química de águas do Município de Apucarana – Pr**. *IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental*, Salvador/BA, 25 a 28/11/2013.

SAITO, Samuel T. et al . A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 26, n. 2, p. 394-400, June 2006 . Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000200023&lng=en&nrm=iso>. access on 16 Mai. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000200023>.

SANTANA, J.S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal**, 2013, *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, 2013.

SCHEFFER et al., **Avaliação das águas do Rio Pitangui através da aplicação de índices de qualidade**, *Terr@Plural*, Ponta Grossa, v.4, n.2, p.163-177, jul./dez. 2010.

SCHEFFER, E.W.O.; BUSCH, O.M.S. **Qualidade da Água**. In: GEALH, A.M., MELO, M.S; MORO, R.S. *Pitangui, rio de contrastes - seus lugares, seus peixes, sua gente*. Ponta Grossa: Editora UEPG, Cap. 5, p. 43-51, 2010.

SEILER, R. L. ZAUGG, S.D., THOMAS, J.M. and HOWCROFT, D.L., **Caffeine and pharmaceuticals as indicators of wastewater contamination in wells**. *Ground Water*, vol. 37, no. 3, p. 405-410. 1999

SERRANO, N. O., et al., **Endocrine-disrupting chemicals. Harmful substances and how to test them**. *Cad. Saúde Pública*, 18: 489-494, 2002

SPENCE, P.I., **Using Caffeine as a Water Quality Indicator in the Ambient Monitoring Program for Third Fork Creek Watershed, Durham, North Carolina**. *Environmental Health Insights* 2015:9(S2) 29–34 doi: 10.4137/EHI.S19588.

SIERPINSKI, S. F. D., **Estudo do Comportamento Espectroscópico do Hormônio 17 α -etinilestradiol e de suas interações com substâncias húmicas**. Qualificação de mestrado, Universidade estadual de Ponta Grossa, 2014.

SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H. **Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 665-676,2011. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000400020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 08 de dez 2015. DOI10.1590/S0100-40422011000400020.

SILVA, E. C.; COSTA, W.; MARQUES, M. B.; SILCA, N. C. e COSTA, R. P. **Um indicativo da relação entre as atividades humanas e a contaminação das águas do Rio Verde – Ponta Grossa – PR**; UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa, 14 (3): 247-254, dez. 2008

SILVA, R. F. et al., **Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto**. *Rev. Virtual Quim*, Vol 8, No. 3, p. 702-715, 2016.

SILVA, Gilberto Silvério da; JARDIM, Wilson de F. **Um novo índice de qualidade das águas para proteção da vida aquática aplicado ao Rio Atibaia, Região de Campinas/Paulinia – SP.** Química Nova, v. 29, n. 4, p. 689-694, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **PRINCÍPIOS DE ANÁLISE INSTRUMENTAL.** 5ª EDIÇÃO. Editora Bookman, 2002

SKOOG, D. A., et al., **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª ed., São Paulo: Thomson, 2006. p.830-932.

CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J.; SKOOG D. A. **Princípios de Análise Instrumental.** 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SOUZA RAG, SICHIERI R, **Consumo de cafeína e de alimentos-fonte de cafeína e prematuridade:um estudo caso-controle**, Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 21(6):1919-1928, nov-dez, 2005.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. **Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue.** *Water Air and Soil Pollution*, v. 206, p. 57-67, 2010.

SOUZA, R.SICHIERI, R. **Consumo de cafeína e prematuridade**, Rev. Nutr., Campinas, 18(5):643-650, set./out., 2005.

OLIVEIRA, M. D. **Nova abordagem do Índice de Qualidade de Água Bruta utilizando a Lógica Fuzzy**, Eng Sanit Ambient | v.19 n.4 | out/dez 2014 | 361-372. DOI: 10.1590/S1413-41522014019000000803

TEODORO, P. e SANTOS, **Qualidade da água da bacia do Rio das Pedras – Guarapuava (PR), baseado nos parâmetros que definem o Índice de Qualidade da Água (IQA)**, GUAIRACÁ v. 25, n. 1 (2009)

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis.** Pure and Applied Chemistry, Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

TOGOLA, A. E BUDZINSKI, H. **Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples.** Journal of Chromatography A, v. 1177, p. 150158, 2008.

TONHI *et al.*, **Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE–FR).** *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 4, 616-623, 2002.

TUBBS, D. FREIRE, R, F. YOSHINAGA, S. **UTILIZAÇÃO DA CAFEÍNA COMO INDICADOR DE CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS POR ESGOTOS DOMÉSTICOS NO BAIRRO DE PIRANEMA –MUNICÍPIOS DE SEROPÉDICA E ITAGUAÍ /RJ, XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, Revista de Águas Subterrâneas, São Paulo, Brasil, 2004.**

TUNDISI JG, 2008. Water resources in the future: problems and solutions. **Estudos Avançados**, 22:7-16. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142008000200002>

USGS United States Geological Survey. Disponível em <<http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>>. Acesso em out. 2015.

VALCÁRCEL, Y.; ALONSO, S. G.; RODRIGUEZ-GIL, J. L.; GIL, A.; CATALÁ, M. **Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk**. *Chemosphere*, v. 84, p. 1336-1348, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.10.105

VALENTE, J. P. S; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. **Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu - SP**. *Eclét. Quím.*, São Paulo, v. 22, p. 49-66, 1997. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46701997000100005&lng=en&nrm=iso>. Access on 12 July 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46701997000100005>.

VALENTINI SR, SOMMER WA, MATIOLI G. **Validação de métodos analíticos**. *Pesticidas: R.Ecotocol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, jan./dez. 2003

VERENITCH, S. MAZUMDER, A. **Development of a methodology utilizing gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of low levels of caffeine in surface marine and freshwater samples**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [1618-2642] Verenitch, Sergei yr: 2008 vol: 391 iss:7 p. 2635-2646. doi: 10.1007/s00216-008-2174-x.

VYSTAVNA, Y.; HUNEAU, F.; GRYNENKO, V.; VERGELES, Y.; CELLE-JEANTON, H.; TAPIE, N.; BUDZINSKI, H.; LE COUSTOMER, p. **Pharmaceuticals in rivers of two regions with contrasted socio-economic conditions: occurrence, accumulation, and comparison for Ukraine and France**. *Water Air and Soil Pollution*, v. 223, p. 2111-2124, 2012. DOI: 10.1007/s11270-011-1008-1

WANG, C.; SHI, H.; ADAMS, C. D.; GAMAGEDARA, S.; STAYTON, I.; TIMMONS, T.; MA, Y. **Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Water Research*, v. 45, p. 1818-1828, 2011. DOI: 10.1016/j.watres.2010.11.043. DOI: 10.1016/j.watres.2010.11.043

ZHANG, J. **The impact of water quality on health: Evidence from the drinking water infrastructure program in rural China** *Journal of health economics*. Vol 31. p. 122-134. 2012. DOI: 10.1016/j.jhealeco.2011.08.008

ZHANG, W.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; ZHAO, S.; DU, H.; MA, X.; and ZHANG, S.; **Sensitive analysis of trace caffeine in human serum by HPLC using tetraazacalix[2]arene[2]triazinmodified silica as SPE sorbent**. *Royal Society of Chemistry* 2016, *Anal. Methods*, vol 8, p. 3613–3619. 2016 DOI: 10.1039/C6AY00594B

ZHU, S.; CHEN, H.; LI, J. **Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan Lake basin, Eastern China.** *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 96, p. 154-159, 2013.

ZIMMERMANN, C. M.; GUIMARÃES, O. M.; PERALTA-ZAMORA, P. G. **Avaliação da qualidade do corpo hídrico do rio Tibagi na região de Ponta Grossa utilizando análise de componentes principais (PCA).** *Química Nova*, v.31, n.7, p.1727-1732, 2008.