



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
CURSO DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

GERMANA DE PAIVA PESSOA

**AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS E DO MICROPOLUENTE
COLESTEROL EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO**

**FORTALEZA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia – BPGE

P567a Pessoa, Germana de Paiva.

Avaliação de desreguladores endócrinos e do micropoluente colesterol em estações de tratamento de esgoto sanitário / Germana de Paiva Pessoa. – 2012.

211 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Saneamento Ambiental

Orientação: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

1. Saneamento. 2. Cromatografia gasosa. 3. Águas residuais - Purificação. I. Título.

GERMANA DE PAIVA PESSOA

**AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS E DO MICROPOLUENTE
COLESTEROL EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: Doutor em Engenharia Civil – Área de Concentração: Saneamento Ambiental

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento

FORTALEZA

2012

GERMANA DE PAIVA PESSOA

**AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS E DO MICROPOLUENTE
COLESTEROL EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Civil – Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Tese defendida e aprovada em: 23/11/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Luciano Matos Queiroz
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Prof. Dr. Antônio Idivan Vieira Nunes
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Silvano Porto Pereira
Companhia de Água e Esgoto do Ceará - CAGECE

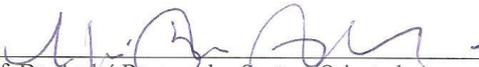
GERMANA DE PAIVA PESSOA

**AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS E DO MICROPOLUENTE
COLESTEROL EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO**

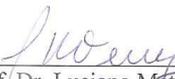
Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Engenharia Civil – Área de concentração: Saneamento Ambiental

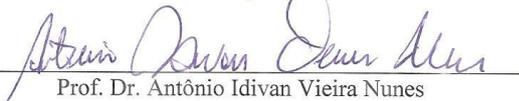
Tese defendida e aprovada em: 23/11/2012

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Luciano Matos Queiroz
Universidade Federal da Bahia – UFBA


Prof. Dr. Antônio Idivan Vieira Nunes
Universidade Federal do Ceará - UFC


Dr. Silvano Porto Pereira
Companhia de Água e Esgoto do Ceará - CAGECE

DEDICATÓRIA

A Deus e aos meus pais,
Francisco e Lenice.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Deus, por me dar forças e me capacitar para a realização dessa pesquisa e do curso de doutorado.

Aos meus pais Francisco e Lenice e ao meu irmão Gustavo pelo amor, carinho, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao orientador Prof. Dr. André Bezerra, pela orientação e dedicação no decorrer desses anos, por suprir às necessidades surgidas ao longo da pesquisa, por cobrar e incentivar o trabalho realizado.

Ao co-orientador Prof. Dr. Ronaldo Nascimento pela orientação e equipamentos oferecidos do Laboratório de Análise Traços – LAT.

Ao meu querido Gilmar Nascimento (Gil), pelo apoio constante, companhia indispensável durante tantos momentos.

As amigas do coração Elisângela Rocha e Neyliane Costa, por me ajudarem a dar os primeiros passos na cromatografia, mas principalmente pela recepção no grupo, pelo crescimento pessoal e profissional, por serem as minhas companheiras de projeto, artigos...

A amiga Patrícia Marques (Pet) pela amizade sincera e por ser minha salvadora na estatística realizada na tese.

A amiga Mayara (May), pela atenção dispendida, pela companhia belíssima durante vários almoços, participação na banca de qualificação.

As amigas Márcia Rodrigues (Márcila) e Suianne Priscilla (Sui) pelos dias divertidos que passamos na salinha da ecotox, compartilhando dúvidas e anseios.

Ao amigo Paulo Igor Firmino (Isgo) pelas conversas memoráveis, pelos ensinamentos valiosos, pela disposição em compartilhar.

A bolsista de IC e amiga Patrícia Moreira (Paty), sem a ajuda dela as minhas filhas (*Daphnias*) não teriam sobrevivido, me acompanhou firmemente na parte de ecotoxicologia.

A bolsista de IC Joana Angélica (Joana meu bem) pela ajuda nos experimentos.

Ao amigo Mauro César, ainda da época do mestrado, pela ajuda nas disciplinas, conselhos, conversas.

A ‘minha filha’ Clarise Albuquerque pelas conversas maravilhosas que tivemos, uma benção espiritual.

Aos amigos de laboratório (LABOSAN): Antonio Lima (Bolim), Bárbara Brant (Barb), Cristina (Cris), Alexandra, Daniel Lima, Karla Jamile, Raquel Studart, Vívian, Fernando Pedro, Geísa, Eliézer, Raphael, Victor, pelas agradáveis companhias, as quais fazem o nosso dia a dia tornar-se mais leve.

Ao colega Alexandre Colzi, pelos conselhos sempre válidos, pela implementação de ideias inovadoras para o grupo.

Ao colega Marcos Erick, pelas conversas sempre muito engraçadas!

A uma das mais recentes amigas Anna Patrícia Florentino (Annnox), por nos fazer rir em qualquer momento.

As amigas do LAT: Giselle Raulino e Carla Bastos, por terem me ajudado na compreensão do processo de adsorção e pela disposição na realização de experimentos.

Ao departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental – DEHA, pelo curso oferecido e sua infraestrutura, principalmente pelo Laboratório de Saneamento - LABOSAN.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pela bolsa concedida e o apoio financeiro do Projeto.

A Companhia de Água e Esgoto do Ceará – CAGECE, pela autorização das coletas de água e esgoto.

Ao Eliabe pela ajuda nas coletas de amostras realizadas pela CAGECE.

As minhas irmãs em Cristo: Lia Veras, Dani Veras, Ludmila e Isadora Lopes, Rhenara Sampaio, Priscila Queiroz que oraram por mim e escutaram a frase incessante: “não posso ir porque tenho de escrever” e mesmo assim me aguentaram e tiveram paciência comigo.

Ao Pastor Valney Veras pelo incentivo e compartilhamento de experiências, pela sabedoria e amizade compartilhada.

A todos que direta e indiretamente contribuíram de alguma forma na minha pesquisa, a qual não é só minha.

'Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas.

A ele, pois, a glória eternamente.'

Romanos 11.36

RESUMO

Os desreguladores endócrinos (DEs), cuja presença em esgotos sanitários deve-se principalmente aos hormônios naturais 17 β -estradiol (E2) e estrona (E1) e ao sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), principal substância ativa do contraceptivo oral, podem causar uma série de distúrbios nos órgãos reprodutores dos seres humanos e animais, haja vista que tais compostos não são prontamente removidos por processos biológicos de tratamento convencionais, sendo lançados de forma inadequada em corpos d'água. No entanto, os compostos supramencionados se encontram em baixas concentrações ($\text{ng.L}^{-1}/\mu\text{g.L}^{-1}$) em matrizes ambientais aquosas, tornando sua detecção e quantificação um desafio analítico. Deste modo, buscou-se desenvolver e otimizar uma metodologia analítica utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) com o objetivo de avaliar a eficiência de remoção dos DEs e do micropoluente colesterol (CHOL) em Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) da Região Metropolitana de Fortaleza, assim como detectá-los em águas superficiais. Foram realizados ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica com os efluentes e DEs, utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* como bioindicador. Foram avaliadas cinco ETEs, sendo quatro tipos de tecnologias, a saber: duas ETEs com lagoa facultativa seguida de lagoa de maturação (LF+LM1 e LF+LM2), lagoa facultativa (LF), lodos ativados seguido da etapa de cloração (LA+Cl) e reator de manta de lodo e fluxo ascendente seguido da etapa de cloração (UASB+Cl). As concentrações médias para os micropoluentes nos efluentes foram: 557,4 ng.L^{-1} (E1); 144,4 ng.L^{-1} (E2); 266,4 ng.L^{-1} (E2-17A); 421,4 ng.L^{-1} (EE2) e 4691,9 ng.L^{-1} (CHOL). Os valores máximos obtidos nas águas superficiais foram de: 212,75 ng.L^{-1} (E1); 256,25 ng.L^{-1} (E2) e 1175 ng.L^{-1} (CHOL). Os estrogênios E2-17A e EE2 não foram detectados. Com relação à remoção dos DEs, as menores eficiências de remoção foram encontradas para os sistemas de baixa taxa (lagoas de estabilização) com 68,1% (LF+LM1); 79,9% (LF+LM2) e 54,0% (LF). Os sistemas de alta taxa obtiveram eficiências de remoção satisfatórias: 93,4% (LA+Cl); 95,4% (UASB+Cl). Para o CHOL o melhor índice de remoção foi obtido na ETE LF+LM2 com 94%, seguida das ETEs LA+Cl (88%) e UASB+Cl (82%). Com relação à avaliação ecotoxicológica aguda, não foi detectada toxicidade no efluente proveniente da ETE LF+LM2, entretanto, nos efluentes da LF+LM1 e LF, a $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ máxima foi de 61% e 57%, respectivamente. O nível de toxicidade nos efluentes das ETE LA+Cl e UASB+Cl foi maior que o obtido nos afluentes. Provavelmente, o aumento de toxicidade deve-se à presença de cloro residual no efluente, uma vez que este era coletado após a etapa de cloração. Tratando-se de toxicidade crônica, foi detectado efeito significativo em termos de reprodução ($p < 0,05$) apenas no efluente proveniente da ETE LF+LM2 com CENO (concentração de efeito não observado) de 20% e CEO (concentração de efeito observado) de 30%. Nos efluentes provenientes das ETE LA+Cl e UASB+Cl, o valor de CEO para a avaliação de sobrevivência foi de 5%, evidenciando a elevada toxicidade. No ensaio realizado com a solução multielementar de estrogênios, o efeito crônico de sobrevivência não foi observado, no entanto foi observado um efeito crônico em termos de mudança de sexo, apresentando valores de CENO e CEO de 2 e 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Em termos de reprodução, o CENO foi de 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e o CEO de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que existe uma necessidade de otimização dos parâmetros operacionais das ETEs com o objetivo de melhorar a eficiência de remoção de micropoluentes.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos. Estação de Tratamento de Efluentes. Cromatografia Gasosa. Ecotoxicidade. Micropoluentes Emergentes.

ABSTRACT

Endocrine disruptors chemicals (EDCs), whose presence in sewage is mainly attributed to the natural hormones 17 β -estradiol (E2) and estrone (E1) and to the synthetic one 17 α -ethinylestradiol (EE2), the main active ingredient of oral contraceptives, can cause a series of disturbances in the reproductive organs of humans and animals, since such compounds are not readily removed by biological processes of conventional treatment, being improperly released into water bodies. However, the above mentioned compounds are found at low concentrations ($\text{ng L}^{-1}/\mu\text{g L}^{-1}$) in aqueous environmental matrices, which make their detection and quantification an analytical challenge. Thus, an analytical methodology using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) was developed and optimized in order to evaluate the removal efficiency of EDs and the micropollutant cholesterol (CHOL) in wastewater treatment plants (WWTPs) from the Metropolitan Area of Fortaleza, as well as to detect them in surface waters. Acute and chronic ecotoxicity tests with effluents and EDs using the microcrustacean *Daphnia magna* as bioindicator. Five WWTPs were evaluated, which were divided in four types of technologies, namely: two WWTPs with facultative pond followed by maturation pond (FP+MP1 and FP+MP2), facultative pond (FP), activated sludge followed by chlorination step (AS+Cl) and upflow anaerobic sludge blanket reactor followed by chlorination step (UASB+Cl). The mean concentrations for micropollutants in effluents were: 557.4 ng.L^{-1} (E1), 144.4 ng.L^{-1} (E2), 266.4 ng.L^{-1} (E2-17A), 421.4 ng.L^{-1} (EE2) and 4691.9 ng.L^{-1} (CHOL). The maximum values obtained in surface water were: 212.75 ng.L^{-1} (E1), 256.25 ng.L^{-1} (E2) and 1175 ng.L^{-1} (CHOL). The estrogens E2-17A and EE2 were not detected. Regarding the EDs removal, the lowest removal efficiencies were found for low-rate systems (stabilization ponds) with 68.1% (FP+MP1), 79.9% (FP+MP2) and 54.0% (FP). The high-rate systems obtained satisfactory removal efficiency: 93.4% (LA+Cl), 95.4% (UASB+Cl). For CHOL, the best removal was obtained by the WWTP FP+MP2 with 94%, followed by the WWTPs AS+Cl (88%) and UASB+Cl (82%). No toxicity was detected in the effluent from the WWTP FP+MP2, however, in the effluents from FP+MP1 and FP, maximum $\text{EC}_{50-48\text{h}}$ was 61% and 57%, respectively. The toxicity level in the effluents from WWTPs UASB and AS was higher than that obtained in the influents. Probably, the toxicity increase was due to the presence of residual chlorine in the effluent since it was collected after the chlorination step. Concerning the chronic toxicity, significant effect in terms of reproduction ($p < 0.05$) was detected only in the effluent from the WWTP FP+MP2 with NOEC (no observed effect concentration) of 20% and OEC (observed effect concentration) of 30%. In the effluents from the WWTPs AS+Cl and UASB+Cl, the OEC value for survival evaluation was 5%, evidencing the high toxicity. In the assay with a multielement estrogens solution, the survival chronic effect was not observed. However, there was a chronic effect in terms of sex change, showing values of NOEC and OEC of 2 and 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. In terms of reproduction, NOEC was 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and CEO of 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Based on these results, it can be concluded that there is a need for optimization of WWTPs operational parameters in order to improve micropollutants removal efficiency.

Keywords: Endocrine disrupting compounds. Waste Wastewater Treatment Plant, Gas Chromatography, Ecotoxicology, Emerging micropollutants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular dos hormônios selecionados para a pesquisa.....	28
Figura 2 – Rotas percorrida pelos desreguladores endócrinos a partir de ações antropogênicas	30
Figura 3 – Rotas de transformação e acumulação de micropoluentes emergentes no meio ambiente natural	32
Figura 4 – Mecanismo de ação dos desreguladores endócrinos	35
Figura 5 – Biotransformação do colesterol a estrona	47
Figura 6 – Esquema da extração em fase sólida.....	50
Figura 7 – Mecanismo de adsorção para retenção de micropoluentes em membranas poliméricas	51
Figura 8 – Representação esquemática das partículas presentes em amostras ambientais aquosas	54
Figura 9 – Reação de silanização a partir dos estrogênios e o reagente de derivatização BSTFA.....	55
Figura 10 – Sistemas de filtração da amostra	57
Figura 11 – Material utilizado para microfiltração do eluato	58
Figura 12 – Sistema <i>Vacuum Manifold</i> utilizado durante a etapa de extração em fase sólida (SPE).....	59
Figura 13 – Equipamento CG/MS (Thermo Scientific)	60
Figura 14 – Fluxograma da estrutura utilizada na elaboração de metodologia da pesquisa	61
Figura 15 – Fluxograma do estudo da derivatização.....	64
Figura 16 – Fluxograma da metodologia utilizada para o planejamento fatorial da etapa de derivatização.....	66
Figura 17 – Fluxograma da metodologia empregada durante a análise de eluente.....	68
Figura 18 – Local de amostragem do Conjunto José Walter, Fortaleza- CE	75
Figura 19 – Local de amostragem na ETE de Tabapuá, localizada em Caucaia, CE.....	75
Figura 20 – Local de amostragem na ETE do Conjunto Nova Metrópole, localizado em Caucaia, CE	76
Figura 21 – Local de amostragem na ETE de lodos ativados do Residencial Itaperussu, Fortaleza, CE	76
Figura 22 – Local de amostragem na ETE do Conjunto Itapery II, utilizando como sistema de tratamento reator UASB, Fortaleza, CE	77

Figura 23 – Exemplo de diagrama de <i>box plot</i>	79
Figura 24 – Pontos de amostragem de águas superficiais dos rios Ceará e Cocó	80
Figura 25 – Vista área dos pontos de amostragem das águas superficiais	81
Figura 26 – Organismo <i>Daphnia magna</i> com 24 horas (lente 40x)	82
Figura 27 – Vidrarias utilizadas no laboratório de ecotoxicologia do LABOSAN.....	83
Figura 28 – Cultivo da alga <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>	85
Figura 29 – Concentrações das soluções testes utilizadas durante os ensaios agudos e crônicos	88
Figura 30 – Aparatos utilizados durante a realização dos ensaios de ecotoxicidade	88
Figura 31 – Medida do comprimento total de <i>Daphnia magna</i>	90
Figura 32 – Fluxograma para análise estatística de dados de testes de toxicidade crônica com uma única concentração e o controle.....	92
Figura 33 – Cromatograma obtido da solução padrão multielementar de hormônios utilizando a coluna OV-5MS	94
Figura 34 – Cromatograma obtido da solução padrão multielementar de hormônios utilizando a coluna SLB-5MS	94
Figura 35 – Espectro de massa do E1 derivatizado com BSTFA.....	95
Figura 36 – Espectro de massa do E2 derivatizado com BSTFA.....	96
Figura 37 – Espectro de massa do E2-17A derivatizado com BSTFA	96
Figura 38 – Espectro de massa do EE2 mono derivatizado com BSTFA	97
Figura 39 – Espectro de massa do EE2 di derivatizado com BSTFA	97
Figura 40 – Espectro de massa do CHOL derivatizado com BSTFA	98
Figura 41 – Cromatograma de comparação dos eluentes acetona e acetona:hexano realizado para os estrogênios	102
Figura 42 – Comparação das áreas dos picos obtidos durante o estudo da acidificação da matriz ambiental	104
Figura 43 – Cromatograma de comparação dos materiais adsorventes avaliados.	105
Figura 44 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da SPE para os hormônios	109
Figura 45 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para E1	111
Figura 46 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para E2	111
Figura 47 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para E2-17A	112
Figura 48 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para EE2 ..	112

Figura 49 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para CHOL	113
Figura 50 – Cromatogramas de comparação das condições de derivatização dos hormônios na ausência e presença do meio reacional	116
Figura 51 – Comparação das áreas dos picos nas condições A e B	117
Figura 52 – Estado de transição do estrogênio E1 derivatizado com MTBSTFA e BTSFA .	119
Figura 53 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para E1	120
Figura 54 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para E2	120
Figura 55 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para E2- 17A	121
Figura 56 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para EE2	121
Figura 57 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para CHOL	122
Figura 58 – Metodologia utilizada para determinação de estrogênios	124
Figura 59 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente dos DEs na ETE:CJW	126
Figura 60 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:CJW	128
Figura 61 – Diagramas de <i>boxplot</i> para as concentrações afluente e efluente dos Des na ETE: TB	129
Figura 62 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:TB	130
Figura 63 – Perfil de remoção dos DEs ao longo do tratamento na ETE: TB.....	130
Figura 64 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente dos DEs na ETE:CNM.....	132
Figura 65 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:CNM	133
Figura 66 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente dos DEs na ETE:LA	135
Figura 67 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:LA	136
Figura 68 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente dos DEs na ETE:UASB	137

Figura 69 – Diagramas de <i>box plot</i> para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:UASB.....	138
Figura 70 – Diagrama de <i>box plot</i> para eficiência de remoção do composto estrona (E1) em ETEs	140
Figura 71 – Diagrama de <i>box plot</i> para eficiência de remoção do composto 17 β -estradiol (E2) em ETEs	142
Figura 72 – Diagrama de <i>box plot</i> para eficiência de remoção do composto 17 β -estradiol-17-acetato (E2-17A) em ETEs.....	144
Figura 73 – Diagrama de <i>boxplot</i> para eficiência de remoção do composto 17 α -etinilestradiol (EE2) em ETEs.....	145
Figura 74 – Diagrama de <i>box plot</i> para eficiência de remoção do composto colesterol (CHOL) em ETEs.....	146
Figura 75 – Cromatograma e espectro de massa obtidos no ponto de amostragem 2 do rio Ceará (P2 CE).....	149
Figura 76 – Cromatograma obtido no ponto de amostragem 2 do rio Cocó (P2CC).....	150
Figura 77 – Curva de crescimento da alga <i>P. subcaptata</i>	152
Figura 78 – Carta controle de sensibilidade do cultivo da <i>D. magna</i> (24 horas) utilizando dicromato de potássio como substância de referência.....	153
Figura 79 – Toxicidade aguda afluente e efluente nas ETEs, termos de toxicidade em U.T. 154	
Figura 80 – Eficiência de remoção (%) de toxicidade por ETE selecionada	156
Figura 81 – Quantidade de organismos adultos distribuídos por gênero ao longo dos 21 dias para o teste crônico realizado com DEs.....	158
Figura 82 – Número total de neonatos gerados por ninhada durante o ensaio crônico com os DEs	160
Figura 83 – Porcentagem do número de neonatos gerados no ensaio crônico da ETE:CJW em termos de deformações morfológicas	162
Figura 84 – Porcentagem do número de neonatos gerados no ensaio crônico da ETE:CNM em termos de deformações morfológicas	162
Figura 85 – Tipos de alterações morfológicas dos neonatos gerados ao longo dos ensaios crônicos com efluentes das ETEs: CJW e CNM	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas dos hormônios selecionados	29
Tabela 2 – Quantidade de estrógenos excretada por humanos	31
Tabela 3 – Legislações adotadas por estados brasileiros que utilizam ensaios ecotoxicológicos no controle de lançamento de efluentes.....	39
Tabela 4 – Recuperação de analitos em diferentes concentrações	53
Tabela 5 – Características dos cartuchos empregados na etapa de extração em fase sólida	59
Tabela 6 – Condições cromatográficas utilizadas na análise de estrogênios com equipamento CG/MS.....	63
Tabela 7 – Condições utilizadas para avaliação dos reagentes derivatizantes BSTFA e MTBSTFA+1% TBDMCS.....	65
Tabela 8 – Planejamento fatorial de otimização da etapa de derivatização	65
Tabela 9 – Propriedades físicas de caracterização das partículas dos cartuchos DSC-18, Oasis HLB e Strata-X.....	69
Tabela 10 – Valores atribuídos aos fatores analisados durante o planejamento fatorial para SPE	70
Tabela 11 – Planejamento fatorial (2^4) para SPE	70
Tabela 12 – Concentração do analito vs Precisão.....	72
Tabela 13 – Estações de tratamento de esgoto selecionadas para avaliação de eficiência de remoção de DES classificadas por tipo de tecnologia empregada	74
Tabela 14 – Coordenadas UTM para os pontos de amostragem dos rios Ceará e Cocó.....	80
Tabela 15 – Fator de concentração e volume de amostra utilizado para as amostras coletadas	80
Tabela 16 – Classificação de toxicidade das amostras em função do valor de CE_{50}	89
Tabela 17 – Parâmetros qualitativos (tempo de retenção e íons de quantificação) utilizados na determinação dos hormônios	93
Tabela 18 – Precisão do método cromatográfico empregando área e tempo de retenção dos compostos na concentração 50 ppb ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). n=10	99
Tabela 19 – Parâmetros de linearidade obtidos na validação do método analítico instrumental para os hormônios.....	100
Tabela 20 – Recuperação (%) dos estrogênios utilizando cartucho DSC-18, concentração $2 \mu\text{g L}^{-1}$, matriz efluente sanitário.....	100
Tabela 21 – Recuperação (%) dos hormônios utilizando cartucho Oasis HLB, concentração 500ng L^{-1} , matriz efluente sanitário, n=2.	101

Tabela 22 – Eficiência de recuperação de estrogênios (%) comparando os eluentes acetona e acetona:hexano (50:50, v/v), na concentração de 50 µg L ⁻¹ , com cartucho DSC-18.....	103
Tabela 23 – Eficiência de recuperação dos analitos durante a avaliação dos materiais adsorventes	106
Tabela 24 – Matriz para o planejamento fatorial (2 ⁴) e áreas dos picos dos cromatogramas obtidos para o método de extração dos hormônios por SPE e análise por GC/MS.....	108
Tabela 25 – Resultados de otimização dos hormônios no planejamento fatorial da SPE.....	114
Tabela 26 – Eficiência de recuperação (%) para os hormônios com adição do Isopropanol (n=2)	115
Tabela 27 – Áreas médias e desvio padrão relativo obtidos na análise dos derivatizantes MTBSTFA e BSTFA	117
Tabela 28 – Matriz para o planejamento fatorial (2 ³) e áreas dos picos dos cromatogramas obtidos para a otimização das condições de derivatização dos hormônios utilizando BSTFA como reagente derivatizante	122
Tabela 29 – Valores de otimização obtidos no planejamento fatorial da etapa de derivatização	122
Tabela 30 – Sumário de todos os compostos detectados em amostras afluentes e efluentes de 5 ETEs na RMF (n=25)	139
Tabela 31 – Sumário das concentrações efluentes obtidas na literatura científica.....	139
Tabela 32 – Eficiência média de remoção (%) dos desreguladores endócrinos em várias tecnologias.....	148
Tabela 33 – Parâmetros físico-químicos dos pontos de amostragem nos rios Ceará e Cocó.	151
Tabela 34 – Valores de CENO e CEO para sobrevivência durante o ensaio de toxicidade crônica	157
Tabela 35 – Valores de CENO e CEO para reprodução durante o ensaio de toxicidade crônica	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϵ°	Grau Eluotrópico
K_{ow}	Coeficiente octanol-água (<i>octanol-water</i>)
m/z	Relação Massa/carga
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSTFA	N, O – bis – (trimetilsilil) trifluoracetamida
C-17	Carbono 17
C-18	Octadecilsilano
CAS	Chemical Abstracts Service (número de registro)
CC	Cocó
CE	Ceará
CE_{50}	Concentração Efetiva Mediana
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CJW	Conjunto José Walter
CNM	Conjunto Nova Metrôpole
CV(%)	Coeficiente de variação
DE	Desregulador Endócrino
DES	Dietilestilbestrol
DPR	Desvio Padrão Relativo
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E2-17A	17 β -estradiol - 17 - acetato
ECOSAR	Ecological Structure Activity Relationships
EE2	17 α - etinilestradiol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FATMA	Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina
FID	Detector de ionização de chama (Flame Ionization Detector)
GC - MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	International Organization for Standardization
LA	Lodos Ativados
LABOSAN	Laboratório de Saneamento
LD	Limite de Detecção
LF	Lagoa Facultativa
LM	Lagoa de Maturação

LQ	Limite de Quantificação
MTBSTFA	N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida
N	Número de pontos utilizados
NBR	Norma Brasileira
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
SETAC	Society of Environmental Toxicology and Chemistry
SIDI	Sistema Intergrado do Distrito Industrial
SPE	Solid Phase Extration – Extração em Fase Sólida
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TMS	Trimetilsilil
t_R	Tempo de Retenção
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> (reator de manta de lodo e fluxo ascendente)
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UT	Unidade Tóxica
VTG	Vitelogenina
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1	Os Desreguladores Endócrinos.....	27
3.2	Características gerais dos desreguladores endócrinos e do micropoluinte colesterol	27
3.3	Excreção de desreguladores endócrinos.....	29
3.4	Ocorrência de desreguladores endócrinos.....	32
3.5	Mecanismo de ação dos DEs.....	34
3.6	Impactos dos desreguladores endócrinos na saúde pública	35
3.7	Efeitos dos Desreguladores Endócrinos em Organismos Aquáticos	37
3.8	Remoção de desreguladores endócrinos e do micropoluinte colesterol em sistemas de tratamento de esgoto.....	40
3.8.1	<i>Sorção</i>	41
3.8.2	<i>Remoção dos desreguladores endócrinos em sistemas biológicos</i>	42
3.8.3	<i>Remoção do micropoluinte colesterol em sistemas biológicos</i>	47
3.9	Métodos Analíticos utilizados para determinação de DEs.....	48
3.9.1	<i>Extração em fase sólida (SPE)</i>	49
3.9.2	<i>Derivatização</i>	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	Material	57
4.1.1	<i>Material utilizado para etapa de filtração da amostra e do eluato</i>	57
4.1.2	<i>Material utilizado na etapa de extração em fase sólida (SPE)</i>	58
4.1.3	<i>Material utilizado para detecção dos desreguladores endócrinos</i>	60

4.2	Desenvolvimento do Método Analítico	62
4.3	Estudos de Derivatização	64
4.4	Otimização da Etapa de Concentração dos Analitos - Extração em Fase Sólida (SPE) .	67
4.4.1	<i>Estudo do eluente</i>	67
4.4.2	<i>Estudo da acidificação da amostra ambiental</i>	68
4.4.3	<i>Avaliação dos materiais adsorventes</i>	69
4.4.4	<i>Planejamento Fatorial para a SPE</i>	69
4.4.5	<i>Estudo da adição do modificador orgânico isopropanol</i>	71
4.5	Validação do Método Analítico	71
4.6	Monitoramento dos desreguladores endócrinos (DEs) e do micropolvente colesterol em esgotos sanitários de ETEs e em águas superficiais	74
4.6.1	<i>Monitoramento dos desreguladores endócrinos e do micropolvente colesterol em esgotos sanitários</i>	74
4.6.2	<i>Tratamento dos dados de concentração dos micropoluentes</i>	78
4.6.3	<i>Identificação dos desreguladores endócrinos em águas superficiais</i>	79
4.7	Ensaio Ecotoxicológicos	82
4.7.1	<i>Cultivo do organismo teste - Daphnia magna</i>	82
4.7.2	<i>Cultivo da alga Pseudokirchneriella subcaptata</i>	84
4.7.3	<i>Curva de crescimento da alga Pseudokirchneriella subcaptata</i>	85
4.7.4	<i>Ensaio de Sensibilidade</i>	86
4.7.5	<i>Ensaio de Toxicidade Aguda</i>	87
4.7.6	<i>Ensaio de Toxicidade Crônica</i>	89
4.7.7	<i>Análise estatística empregada para o cálculo de CENO e CEO</i>	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1	Desenvolvimento do método analítico.....	93
5.2	Validação do Método Analítico	99

5.3	Otimização da Etapa de Concentração dos Analitos - Extração em Fase Sólida (SPE)	102
5.3.1	<i>Estudo do eluente</i>	102
5.3.2	<i>Estudo da acidificação da amostra ambiental</i>	103
5.3.3	<i>Avaliação dos materiais adsorventes</i>	104
5.3.4	<i>Planejamento Fatorial para SPE</i>	107
5.3.5	<i>Estudo da adição do modificador orgânico isopropanol</i>	114
5.4	Estudos de derivatização	115
5.5	Monitoramento dos desreguladores endócrinos (DEs) e do micropoluinte colesterol em esgotos sanitários de ETEs e em águas superficiais na Região Metropolitana de Fortaleza (RMF)	125
5.5.1	<i>Monitoramento dos desreguladores endócrinos e do colesterol em esgotos sanitários</i>	125
5.5.2	<i>Eficiência de remoção dos DEs e colesterol nas tecnologias de tratamento analisadas</i>	140
5.5.3	<i>Identificação dos desreguladores endócrinos e micropoluinte colesterol em águas superficiais</i>	148
5.6	Estudos Ecotoxicológicos	152
5.6.1	<i>Curva de crescimento da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i></i>	152
5.6.2	<i>Ensaio de sensibilidade</i>	153
5.6.3	<i>Ensaio de toxicidade aguda</i>	154
5.6.4	<i>Ensaio de toxicidade crônica</i>	157
6	CONCLUSÃO	164
7	RECOMENDAÇÕES	166
	REFERÊNCIAS	167
	APÊNDICE A – Curvas analíticas obtidas durante a calibração externa dos hormônios	193
	APÊNDICE B – Espectros de massa dos DEs e do micropoluinte em esgotos sanitários	194
	APÊNDICE C – Concentrações dos DEs e do micropoluinte colesterol nas ETEs	197

APÊNDICE D – Testes estatísticos aplicados na determinação de CENO e CEO.....	207
ANEXO A – Dados de projetos das ETEs selecionadas	209
ANEXO B – Metodologia utilizada para análises físico-químicas e microbiológicas.....	211
ANEXO C – Índice de precipitação na cidade de Fortaleza, nos anos de 2010- 2012	212

1 INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico mundial inseriu no mercado uma ampla variedade de substâncias ou compostos químicos utilizados para os mais variados usos, como em medicamentos, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas e aditivos alimentares, entre outros, os quais representam um risco ambiental e de saúde pública quando atingem várias matrizes ambientais. Nas duas últimas décadas observa-se um crescente interesse científico e debates públicos sobre os potenciais efeitos adversos causados pela exposição a um grupo de produtos químicos que são capazes de alterar o funcionamento normal do sistema endócrino da fauna silvestre e, potencialmente, dos seres humanos (WHO, 2002). Esse assunto emergiu devido ao aumento na detecção de anomalias, problemas de infertilidade e aumento na taxa de câncer nos órgãos reprodutores (CRAIN *et al.*, 2008; EERTMANS *et al.*, 2003).

Certamente, o desenvolvimento de técnicas analíticas permitiu a identificação e quantificação desses compostos em matrizes diversas, contribuindo para a inserção de uma correlação entre a presença dos compostos e o surgimento das anomalias. Alguns autores acreditam que substâncias como os hormônios, dependendo da dose e do tempo de exposição, estão relacionadas com doenças como câncer de mama, testicular e de próstata, ovários policísticos e redução da fertilidade masculina (CARLSEN *et al.*, 1992; OLSEN, 1995; SWAN *et al.*, 1997). A ocorrência de hermafroditismo e troca de sexo em peixes presentes em corpos receptores localizados próximos a estações de tratamentos de efluentes (PURDOM *et al.*, 1994) levaram a desenvolver a hipótese de que compostos químicos, dentre eles substâncias estrogênicas, eram capazes de desregular o sistema endócrinos dos peixes.

A Organização Mundial de Saúde (2002) através do Programa Internacional de Segurança Química definiu esse grupo de compostos químicos como Disruptores Endócrinos (DE), sendo a definição:

“Um disruptor endócrino em potencial é uma substância ou mistura exógena que possui propriedades que podem gerar uma desordem no sistema endócrino de um organismo sadio, ou seus descendentes, ou (sub) populações.”

Neste trabalho, o termo desregulador endócrino (DE) será utilizado como sinônimo de perturbadores endócrinos, disruptores endócrinos, interferentes endócrinos, que na literatura internacional corresponde aos *endocrine disrupting chemicals* ou *endocrine disrupting compounds* (EDC).

Os principais DEs relatados na literatura podem ser substâncias naturais ou sintéticas, dentre os quais podem ser citados: pesticidas como atrazina; subprodutos da degradação de alquilfenóis polietoxilados como 4-nonilfenol (NP); hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA); aditivos plastificantes como dietilhexilftalato (DEHP); compostos industriais como bisfenol A (BPA); metais pesados como cádmio, mercúrio e chumbo; hormônios sintéticos como dietilestilbestrol (DES) e 17 α -etinilestradiol (EE2); fitoestrogênios como genisteína e metaresinol e os hormônios naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3).

Os principais compostos que apresentam elevada atividade estrogênica são os hormônios naturais E1 e E2, e o hormônio sintético EE2, principal substância ativa do contraceptivo oral.

Os excrementos humanos presentes no esgoto sanitário representam a principal fonte de contaminação por estrogênios naturais no meio ambiente, devido ao lançamento de esgotos *in natura* em corpos de água ou mesmo devido à sua incompleta remoção nos processos convencionais de tratamento de esgoto. Com o aumento populacional e das taxas de urbanização verificadas nas cidades, espera-se um aumento dos volumes de esgoto gerados e da quantidade de estrogênios lançados continuamente em corpos receptores, muitos dos quais possuem baixa capacidade de diluição (WATKINSON *et al.*, 2007).

A grande maioria dos DEs possui características lipofílicas e, frequentemente, apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente (LINTELMANN *et al.*, 2003). Essas propriedades intrínsecas apresentam um grande potencial para bioacumulação (de MES *et al.*, 2005) e persistência no ambiente (CARBALLA *et al.*, 2007).

A remoção e o comportamento dos DEs no meio ambiente, ainda, não são totalmente conhecidos, conseqüentemente, os riscos aos humanos, organismos aquáticos e outros animais, ainda precisam ser melhores compreendidos (BHANDARI *et al.*, 2009).

A literatura cita um grande espectro de tipos e concentrações de DEs, sendo essa última dependente, principalmente, do maior ou menor uso da água nas atividades domésticas. Ademais, a informação existente em relação à remoção desses compostos em estações de tratamento de esgotos é normalmente investigada em sistemas de lodos ativados. Pouco se conhece sobre a remoção de DEs em sistemas de baixo custo de tratamento de esgotos, como lagoas de estabilização, sistemas anaeróbios, anaeróbios/aeróbios, etc.

Poucos estudos efetivamente contemplam a análise da tecnologia de lagoas de estabilização, as quais representam uma das principais tecnologias de tratamento de esgotos

no Brasil (LEITE *et al.*, 2010). Adicionalmente, fatores como: maior ou menor capacidade de diluição, fotólise, volatilização, adsorção nos sedimentos/lodo nas ETEs, adsorção nos sedimentos dos corpos receptores, etc., podem interferir positivamente ou negativamente na persistência desses compostos ou nos possíveis impactos ambientais ou riscos associados à saúde pública.

Técnicas avançadas com elevada precisão são requeridas para análise de micropoluentes emergentes em ETEs, uma vez que esses compostos encontram-se em baixas concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$, ng.L^{-1}) e as matrizes apresentam elevada complexidade devido à presença de interferentes, o que torna desafiador a sua determinação e quantificação (GABET *et al.*, 2007).

Além da detecção analítica dos DEs para avaliar a eficiência de remoção dos sistemas de tratamento de esgoto são utilizados os ensaios ecotoxicológicos, os quais podem ser utilizados como ferramenta eficiente na análise de remoção de compostos tóxicos e revelar os efeitos dos DEs, presentes nos esgotos sanitários, em organismos aquáticos. Em vários países ensaios ecotoxicológicos são utilizados no gerenciamento de esgotos sanitários por apresentarem vantagens particulares como proteger o tratamento biológico e evitando que afluentes tóxicos reduzam a eficiência das ETEs.

Ensaio ecotoxicológicos utilizando o bioindicador *Daphnia magna* podem ser utilizados para determinar a toxicidade de um determinado composto químico, ou até mesmo de efluentes sejam eles de origem doméstica, hospitalar ou industrial. Segundo um grupo de pesquisadores de Portugal os testes agudos realizado em ratos podem ser substituídos pela avaliação com *D. magna*, uma vez que estes organismos apresentam até maior sensibilidade quando comparado aos ratos, o estudo contemplou diversos dados da literatura científica para traçar essa relação (GUILHERMINO *et al.*, 2000).

Diante do exposto, este trabalho visa desenvolver metodologias para identificação e quantificação de DEs em esgotos sanitários e corpos receptores, bem como da realização de estudos de ecotoxicidade aguda e crônica em *Daphnia magna*. Busca-se primordialmente avaliar algumas das principais tecnologias de tratamento de esgotos utilizadas no Estado do Ceará em termos de remoção de micropoluentes, de forma a subsidiar projetos futuros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de remoção de desreguladores endócrinos e do micropolvente colesterol em sistemas de tratamento de esgotos sanitários, verificar suas presenças em corpos receptores e realizar estudos de ecotoxicidade em *Daphnia magna*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver uma metodologia analítica para identificação e quantificação dos micropoluentes: estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol-acetato, e colesterol em esgotos sanitários utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS);
2. Otimizar a metodologia de derivatização, analisando: tipo de derivatizante, meios reacionais, volume de derivatizante e tempo de reação;
3. Otimizar a etapa de concentração dos analitos por meio da técnica de extração em fase sólida (SPE);
4. Realizar planejamento fatorial para as etapas de preparação da amostra: SPE e derivatização;
5. Realizar a validação do método analítico de determinação por meio da análise da precisão, linearidade e recuperação;
6. Avaliar as tecnologias: lagoas de estabilização, lagoas de estabilização seguida de lagoa de maturação, lodos ativados e reator UASB. Avaliação em termos de remoção de micropoluentes;
7. Identificar a presença de hormônios e colesterol nos rios Ceará e Cocó, localizados no município de Fortaleza;
8. Realizar ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica com efluentes das ETEs selecionadas e com a solução padrão dos hormônios utilizando *Daphnia magna* como organismo-teste.
9. Obter CE_{50-48h} , CENO e CEO nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os Desreguladores Endócrinos

O sistema endócrino é formado por glândulas como tireóide, gônadas, supra-renais e pelos hormônios (tiroxina, estrogênios e progestagênios, testosterona e adrenalina), que por elas são sintetizados (GHISELLI e JARDIM, 2007). Os mensageiros do sistema endócrino são hormônios sintetizados e excretados a baixas concentrações por glândulas específicas, os quais são transportados até o órgão alvo através da corrente sanguínea (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Os compostos que afetam o funcionamento hormonal nos humanos e animais, alterando suas funções normais e causando diminuição de fertilidade, assim como o processo de feminização de peixes, são classificados como desreguladores endócrinos (DEs).

Dentre os compostos classificados como desreguladores endócrinos estão substâncias naturais e sintéticas. Como alguns exemplos específicos de DEs são citados: pesticidas como atrazina, surfactantes alquilfenóis-etoxilados como nonilfenol (NP), hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), aditivos plastificantes como dietilhexilftalato (DEHP), compostos industriais como bisfenol A, metais pesados como cádmio, mercúrio e chumbo, hormônios sintéticos como dietilestilbestrol (DES) e 17 α -etinilestradiol, fitoestrogênios, como genisteína e metaresinol e os hormônios naturais 17 β -estradiol, estrona e estriol (USEPA, 1997; CEC, 2001).

3.2 Características gerais dos desreguladores endócrinos e do micropoluinte colesterol

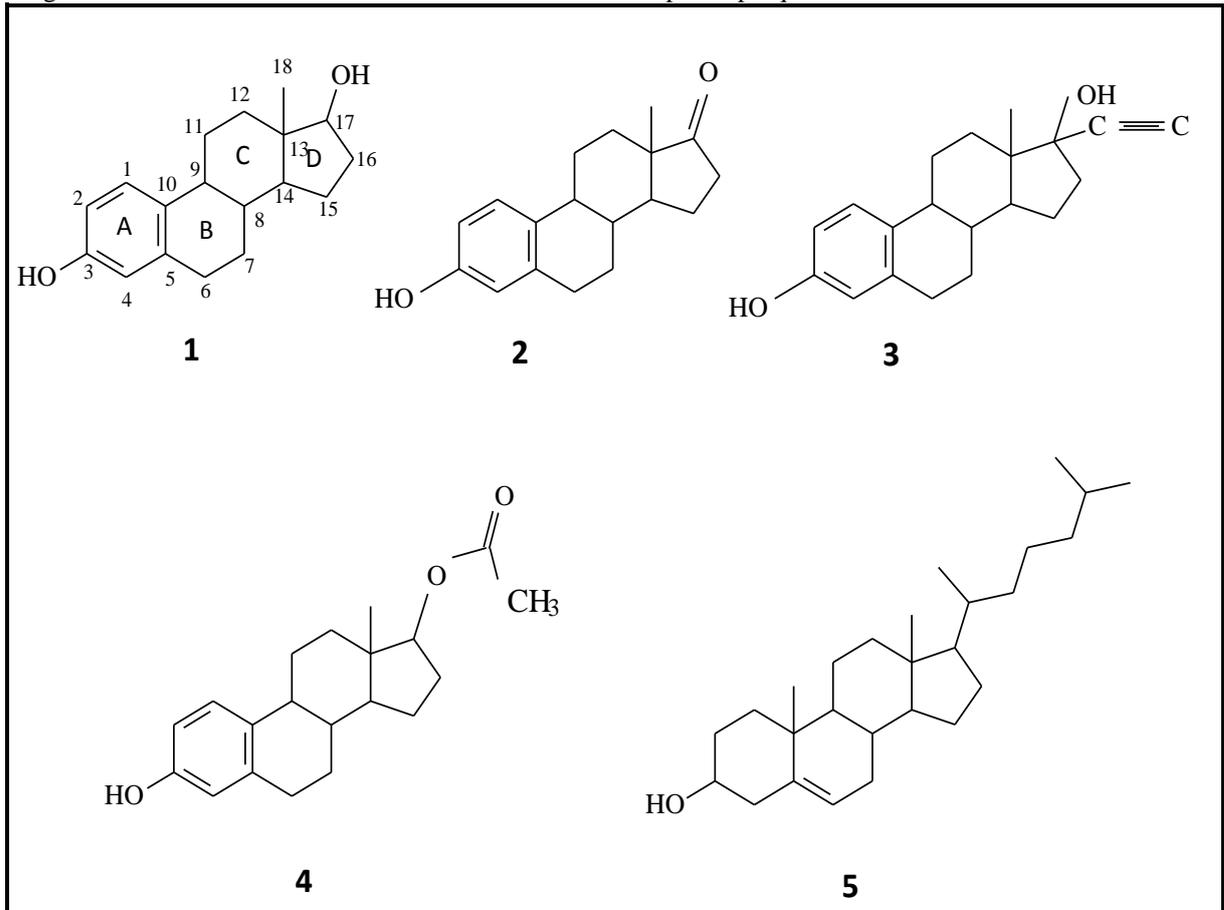
Os hormônios esteróides são derivados bio-sinteticamente do colesterol, incluindo os estrogênios (estrona e 17 β -estradiol) e os androgênios (testosterona e 4-androsteno-3,17-dione). Esses compostos regulam o metabolismo, crescimento e reprodução em vertebrados.

O hormônio natural 17 β -estradiol, produzido pelo ovário e placenta, é o hormônio que apresenta maior potencial estrogênico, o qual é produzido naturalmente nos organismos femininos, enquanto a testosterona é o hormônio masculino mais importante formado nos testículos (FAHRBACH, 2006).

Terapeuticamente, estrogênios são usados em contraceptivos orais, reposição hormonal durante a menopausa e em tratamentos de algumas doenças progressivas como

câncer. Entre as substâncias utilizadas estão o estradiol e seus derivados, como etinilestradiol, mestranol, estriol, estrona, poliestradiol e epimestrol (RODRIGUEZ-PINILLA e WEBER-SCHÖNDORFER, 2007). Schlüsener e Bester (2005) classificaram o composto 17β -estradiol - 17 - acetato (E2-17A) como agente contraceptivo. Na Figura 1 estão apresentadas as estruturas moleculares de alguns hormônios esteróides citados.

Figura 1 – Estrutura molecular dos hormônios selecionados para a pesquisa



Fonte: AUTORA, 2012

Legenda: 1) 17β -estradiol; 2) estrona; 3) 17α -etinilestradiol; 4) 17β -estradiol; - 17-acetato; 5) Colesterol

Basicamente, os hormônios esteróides apresentam características físico-químicas semelhantes como pode ser observado na Tabela 1.

Os desreguladores endócrinos E1, E2, E2-17A e EE2 apresentam um coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) variando de 3 a 5, esses valores elevados indicam que os compostos tem um potencial médio à sorção em matéria orgânica (NOPPE, 2006). A hidrofobicidade estimada pelo $\log K_{ow}$ é um fator importante a ser considerado na escolha do tipo de extração (TOMSÍKOVÁ *et al.*, 2012), uma vez que, pode-se obter uma indicação da força de polaridade do composto.

Compostos que apresentam $\log K_{ow} < 2,5$ são caracterizados por alta hidrofiliabilidade e baixa tendência de absorção na biomassa e nas frações lipídicas dos sólidos suspensos. Para aqueles que apresentam o $\log K_{ow}$ entre 2,5 e 4,0, espera-se uma tendência moderada de absorção nessas matrizes. Já os compostos com $\log K_{ow} > 4,0$ são altamente hidrofóbicos e têm um grande potencial para serem encontrados sorvidos nos sólidos presentes nos sistemas de tratamento de esgoto (ROGERS, 1996).

A constante pKa mostra a constante de dissociação ácida do composto, a qual ocorre quando o hormônio perde um átomo de hidrogênio e torna-se carregado negativamente. Os hormônios tem um grupo hidroxila fenólico totalmente dissociado na faixa de pH entre 10,2 – 10,5, ou seja, os hormônios são facilmente dissociados em faixa de pH básica e em pH ácido permanecem na forma não dissociada (SCHÄFER *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Características físico-químicas dos hormônios selecionados

Nome da substância	Estrona (E1)	17 β -Estradiol (E2)	17 α -Ethinilestradiol (EE2)	17 β -Estradiol - 17-Acetato (E2-17A)	Colesterol (CHOL)
Fórmula Química	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	C ₂₇ H ₄₆ O
Peso molecular (g/mol)	270,37	272,39	296,4	314,42	386,66
CAS-Number	53-16-7	50-28-2	57-63-6	1743-60-8	57-88-5
Solub. em água 20°C (mg/L)	0,8 – 12,4	3,9 – 13,3	4,8	1,37	0,095 ⁶
Log K _{ow}	3,43 ¹	3,94 ¹	4,15 ¹	4,95 ²	8,74 ⁶
pKa	10,34 ³	10,23 ³	10,5 ⁴	10,26 ⁵	NL ⁶
Tamanho (nm)	0,396 ¹	0,398 ¹	0,416 ¹	NL	NL

Fonte: ¹de MES *et al.*(2005); ²calculado pelo programa ECOSAR-EPA;³ KWON *et al.*(2006) ; ⁴ BHANDARI *et al.* (2009);⁵TOMSÍKOVÁ *et al.* (2012); ⁶SAHAR *et al.* (2011).

Legenda: NL: Dado não localizado

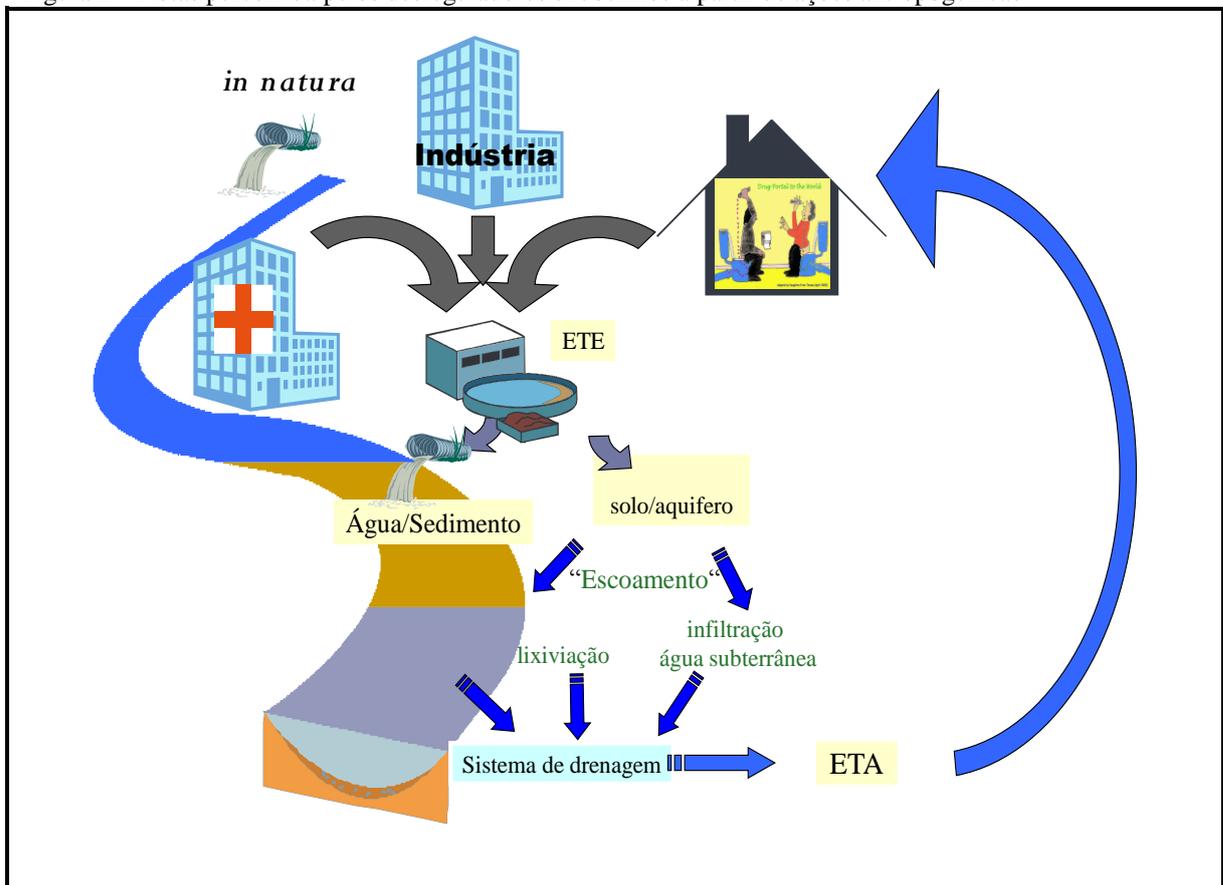
3.3 Excreção de desreguladores endócrinos

A principal fonte de poluição dos desreguladores endócrinos, em especial os estrogênios, são as estações de tratamento de esgoto (ETEs) que tratam esgotos sanitários, hospitalares e/ou provenientes de indústrias químicas, assim como efluentes da criação de animais e da agricultura (PAL *et al.*, 2010). Os três principais compostos que apresentam elevada atividade estrogênica são identificados como hormônios naturais 17 β -estradiol (E2) e

estrona (E1) e hormônio sintético 17α -etinilestradiol (EE2), principal substância ativa do contraceptivo oral.

Os desreguladores endócrinos não são prontamente removidos em processos biológicos de tratamento convencionais sendo lançados de forma inadequada em corpos d'água resultando na contaminação de rios, lagos, estuários e, em alguns casos, em águas subterrâneas. Além disso, o lodo gerado no processo (biosólidos) pode ser aplicado em campos agrícolas, podendo causar contaminação no solo, águas superficiais e percolação subterrânea (MIÈGE *et al.*, 2009). Na Figura 2 estão apresentadas as rotas dos desreguladores endócrinos a partir de ações antropogênicas.

Figura 2 – Rotas percorrida pelos desreguladores endócrinos a partir de ações antropogênicas



Fonte: AUTORA, 2012

Os estrogênios são compostos hidrofóbicos, o que dificulta a eliminação destes através da urina, para tanto precisam se transformar em compostos mais solúveis para que sejam eliminados pelos rins. Os estrogênios são transformados pelo sistema metabólico humano em conjugados solúveis, uma reação na qual perdem sua atividade estrogênica (ANDERSEN *et al.*, 2004).

O processo de conjugação é mediado por enzimas e são gerados ésteres de ácido glicuronídeo e sulfato. Na urina humana estrogênios naturais ocorrem apenas nas formas conjugadas, as quais são transformadas em suas formas originais por micro-organismos e enzimas presentes no esgoto doméstico (ANDERSEN *et al.*, 2004). A razão pela qual os estrogênios passam a se apresentar em sua forma original após sua excreção é a ação da bactéria *Escherichia coli*, que produz a enzima β -glucuronidase a qual hidrolisa os conjugados de volta a forma original (TERNES *et al.*, 1999a). Em ETEs do tipo lodos ativados essa reação ocorre em menos de uma hora (JOSS *et al.*, 2004).

Organismos diferentes excretam uma quantidade variada de esteróides sexuais, dependendo de alguns fatores tais como a idade, estado de saúde, alimentação, ou estado de gravidez (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios de hormônios esteróides excretados por humanos.

Tabela 2 – Quantidade de estrógenos excretada por humanos

Hormônio	Excreção Homem ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Excreção Mulher¹ ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Excreção Grávidas² ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)
17 β -Estradiol	1,6 ²	0,3-5	259
Estrona	3,9 ²	2-20	600
Estriol	1,5 ²	3-65	6000
Andrógeno	2100-23100 ¹	800-10500	-

Fonte: ¹ LINTELMANN *et al.*, 2003; ² REIS FILHO *et al.*, 2006.

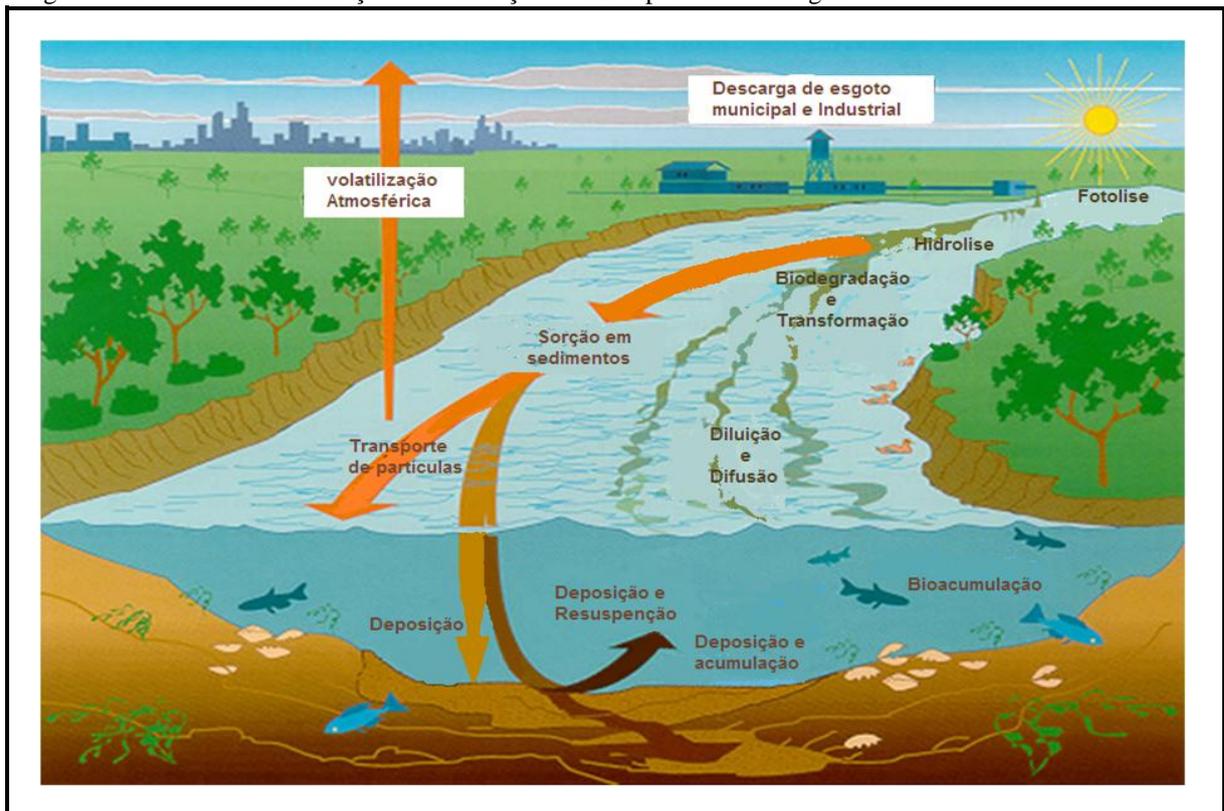
A dose média diária ingerida do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol, presente nas pílulas contraceptivas, é de 35 μg , quando ingerida por um período de 21 a 28 dias. Dessa dose diária 22-50% é excretada na urina, sendo aproximadamente 64% na forma conjugada e 30% excretada nas fezes (De MES *et al.*, 2005).

3.4 Ocorrência de desreguladores endócrinos

Os estrogênios podem ser encontrados em águas superficiais, sedimentos de lagoas ou ainda bioacumulado em organismos aquáticos.

Na Figura 3 são mostradas as possíveis rotas de acumulação de micropoluentes emergentes no meio ambiente natural.

Figura 3 – Rotas de transformação e acumulação de micropoluentes emergentes no meio ambiente natural



Fonte: SOUZA, 2011.

No Brasil, a principal fonte de contaminação ambiental das águas se dá através de esgotos domésticos não tratados, uma vez que a grande maioria dos efluentes urbanos não passa pelo processo de tratamento terciário para remoção de nutrientes e desinfecção (SILVA; COLLINS, 2011). Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico realizada em 2008 (IBGE, 2010) 74,4% dos municípios brasileiros utilizam rios como corpos receptores, evidenciando assim a importância da análise do impacto dos efluentes nesses corpos d'água.

Um projeto realizado no Reino Unido compilou 58.000 dados de detecção de desreguladores endócrinos em 22 países, sendo detectada a presença de DEs em 47% das águas superficiais e 2% em água potável (TOURAUD *et al.*, 2011).

Magi *et al.* (2010) detectaram a presença do DE estrona no afluente de uma estação de tratamento de água (ETA) localizada na Itália, na concentração de 12-16 ng.L⁻¹, a ETA recebia várias fontes de águas superficiais. Através de ensaios de atividade estrogênica em conjunto com análise cromatográfica Jiang *et al.* (2012) reportaram a ocorrência dos estrogênios em rios utilizados como reservatórios na China, as concentrações encontradas em um dos reservatórios para E1, E2 e EE2 foram 2,89; 1,78; 2,67 ng.L⁻¹, respectivamente.

Existem poucos dados que tratam da transferência de desreguladores endócrinos através da cadeia alimentar, a maioria das pesquisas apresentam resultados da bioconcentração em peixes de fármacos e hormônios mais consumidos (TOURAUD *et al.*, 2011). Al-Ansari *et al.* (2010) detectaram EE2 em peixes coletados próximo à descarga de efluentes de sistema de tratamento de esgoto sanitário no Canadá, a concentração média foi de ng g⁻¹, evidenciando assim o poder de bioacumulação dos estrogênios.

Apenas a partir da década de 90 estudos sobre remoção de estrogênios em sistemas de tratamento de esgoto vêm sendo reportados na comunidade científica internacional.

Uma pesquisa intitulada “Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP)”, conduzida na Unicamp entre os anos de 2001 a 2006, revelou que durante quatro anos de coletas de amostras de água bruta e água potável oriundas da Sub-Bacia do Rio Atibaia, houve a presença das seguintes substâncias na água potável distribuída à população: dietilftalato, dibutilftalato, cafeína, bisfenol A, estradiol, etinilestradiol, progesterona e colesterol. No Atibaia, as amostras de água bruta revelaram concentrações significativas do fármaco diclofenaco (5 µg.L⁻¹) e dos hormônios estradiol (3 µg.L⁻¹), etinilestradiol (1,7 µg.L⁻¹) e progesterona (1,4 µg.L⁻¹) (GHISELLI, 2006).

Foi realizado um estudo na Coréia do Sul analisando 7 ETEs que descartavam efluentes em um rio com 115 km de extensão, sendo que 6 ETEs utilizavam a tecnologia de lodos ativados. Além dos efluentes, as águas superficiais do rio que recebia os efluentes tratados, assim como os três maiores rios adjacentes, foram analisadas quanto à presença de micropoluentes. As concentrações encontradas nos efluentes descartados nos rios foram de 14 ng.L⁻¹ para E1, abaixo de 1,0 ng.L⁻¹ para E2 e 1,3 ng.L⁻¹ para EE2. Na análise de águas superficiais só foi encontrado o estrogênio natural E1 na concentração de 3,6 ng.L⁻¹ (KIM *et al.*, 2007).

3.5 Mecanismo de ação dos DEs

Os hormônios liberados de várias glândulas percorrem a corrente sanguínea para agir em células alvos distantes. As funções sob controle hormonal incluem crescimento, manutenção, osmorregulação, reprodução e comportamento, entre outros (ECKERT *et al.*, 2008).

Embora as moléculas dos hormônios entrem em contato com os tecidos do corpo, apenas células que contenham receptores específicos para um hormônio particular são afetadas por ele. A quantidade de hormônio produzida por uma glândula endócrina geralmente é pequena e diluída no sangue e no líquido intersticial. Dessa forma os hormônios devem ser eficientes em concentrações muito baixas, tipicamente entre 10^{-8} e 10^{-12} M. A alta sensibilidade da sinalização hormonal é oriunda de alta afinidade dos receptores de células alvos pelos hormônios (ECKERT *et al.*, 2008).

Os estrógenos e andrógenos são importantes em ambos os sexos em vários aspectos do crescimento, do desenvolvimento e da diferenciação morfológica, bem como no desenvolvimento e na regulação do comportamento e dos ciclos sexual e reprodutivo. Os andrógenos desencadeiam o desenvolvimento das características sexuais masculinas primárias no embrião e das características secundárias, além de contribuir para síntese proteica miofibrilar no músculo. Já os estrógenos estimulam o desenvolvimento tardio das características sexuais primárias como útero, ovário e vagina e também são responsáveis pelas características secundárias como as mamas e pela regulação dos ciclos reprodutivos (ECKERT *et al.*, 2008).

Quanto à ação biológica, os desreguladores endócrinos também podem ser classificados em: agonista (mimetização de um hormônio natural) ou antagonista (bloqueio de hormônio).

A interferência dos desreguladores endócrinos no funcionamento do sistema endócrino pode ocorrer, no mínimo, por três formas:

a) Imitando a ação de um hormônio natural produzido pelo organismo: um composto exógeno liga-se ao receptor como uma substância natural e o ativa, essa ligação depende da afinidade do exógeno com o receptor. A ativação desse hormônio receptor causa os mesmos efeitos do que causaria um hormônio endógeno, como exemplo bastantes conhecidos tem-se os hormônios sintéticos dietilestilbestrol (DES) e o etinilestradiol.

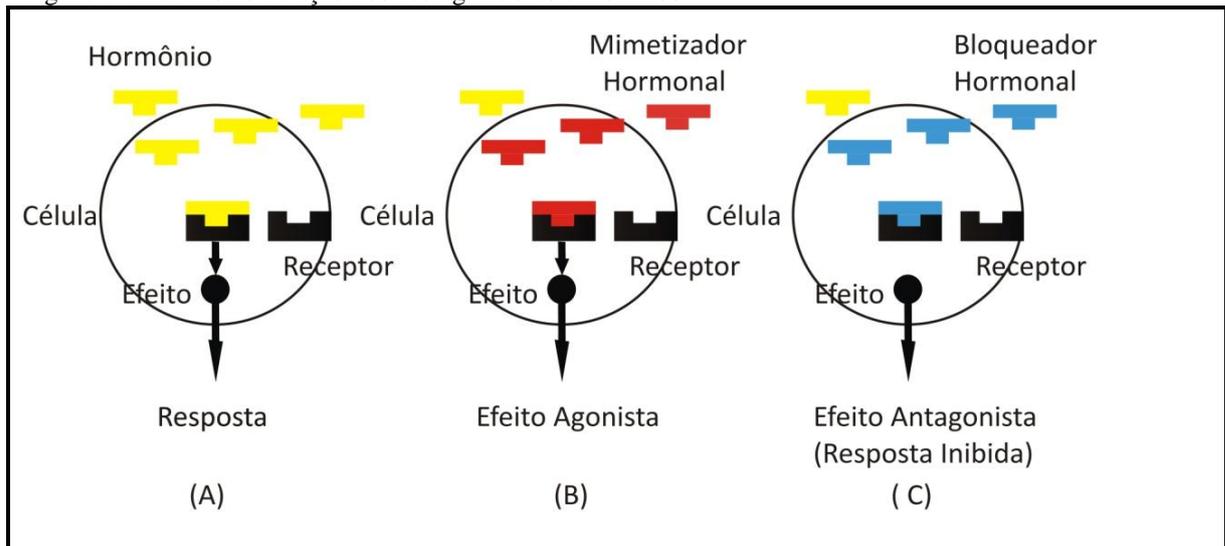
b) Bloqueio dos receptores das células: um composto liga-se ao hormônio receptor bloqueando ou diminuindo as respostas normais porque o receptor não pôde ser

ativado normalmente. Os herbicidas linuron, vinclozolin e seus metabólitos são compostos tipicamente antagonistas que competem para se ligarem aos sítios dos androgênios, e o fármaco tamoxifeno compete para se ligar ao sítio dos estrógenos.

c) Alteração da síntese, transporte, metabolismo e excreção dos hormônios naturais (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Tanto para agonista e antagonista a concentração do composto que estiver se ligando ao hormônio receptor tem um papel importante, pois as concentrações dos hormônios endógenos são normalmente muito baixas, então se a concentração dos xenobióticos no organismo for alta, os efeitos da desregulação endócrina podem ser causados mesmo se a afinidade dos xenobióticos com o hormônio receptor for baixa (LINTELMANN *et al.*, 2003). Na Figura 4 estão apresentados os mecanismos de ação dos DEs.

Figura 4– Mecanismo de ação dos desreguladores endócrinos



Fonte: GHISELLI, 2006

Legenda: a) resposta natural; b) efeito agonista; c) efeito antagonista

3.6 Impactos dos desreguladores endócrinos na saúde pública

Pesquisadores como Crain *et al.* (2008) vêm relacionando problemas de desordem reprodutiva feminina com compostos classificados como desreguladores endócrinos, tais como: alterações no ovário e no útero, aneuploidia (anomalia nos cromossomos), infertilidade, ovários policísticos, endometriose, aumento da predisposição ao câncer de mama, aparecimento precoce de mama em crianças, puberdade precoce e redução do tempo de lactação.

Os autores Rodriguez-Pinilla e Weber-Schöndorfer (2007) citam que vários estudos já foram realizados analisando a relação entre contraceptivos orais e a síndrome de Down. Alguns casos sugeriram que há um aumento no risco da síndrome quando mulheres ingerem o estrogênio durante o mês anterior a concepção ou mesmo durante a gestação.

Em relação às alterações no sistema masculino, vários autores (CARLSEN *et al.*, 1992; OLSEN *et al.*, 1995; SWAN *et al.*, 1997) concluíram que a qualidade do esperma em todo o mundo caiu 40% desde a década de 40, no entanto, havia diferenças regionais na qualidade do esperma sugerindo que o fator meio ambiente estaria relacionado com este fato. Bibbo *et al.* (1978) concluíram que homens que tinham sido expostos ao dietilestilbestrol (DES) durante a gravidez de suas genitoras apresentaram um decréscimo na concentração de esperma e no percentual de mobilidade de espermatozoides.

Em países ocidentais, o câncer testicular é o tumor maligno mais comum entre os jovens, podendo surgir durante a fase embrionária, onde o aumento da exposição de andrógenos e/ou estrógenos são fatores potencialmente importantes para o desenvolvimento de células carcinoma (EERTMANS *et al.*, 2003). O risco de anomalia na posição do testículo denominada de criptorquidia foi maior em filhos de mulheres que trabalhavam com pesticidas. Foram encontradas concentrações significativamente altas de hexaclorobenzeno e heptacloroepóxido em tecidos adiposos de garotos com má formação testicular (WEIDNER *et al.*, 1998; HOSIE *et al.*, 2000).

Exposição (*in vitro* ou neonatal) a baixas doses de desreguladores endócrinos: dietilestilbestrol (DES), 17 α -etinilestradiol, Bisfenol A (BPA), Bisfenol Policlorado (PCB) têm sido reportados em alguns estudos como agentes que aumentam o tamanho ou largura da próstata sugerindo que estes agentes influenciam o aparecimento e desenvolvimento do câncer de próstata (GUPTA, 2000).

Alguns desreguladores endócrinos apresentam potencial mutagênico, tais como: bisfenóis, alquilfenóis, organoclorados e ftalatos (HESS-WILSON e KNUDSEN, 2006). O ftalato vem sendo relacionado ao desenvolvimento de mutações no sistema reprodutor do homem (SWAN *et al.*, 2005). Outro composto potencial de mutagênese é o metal cádmio (Cd), o qual pode induzir lesões pré-neoplásicas e câncer de próstata (WAALKES *et al.*, 1999). O aumento de casos de doenças relacionados aos desreguladores endócrinos é cada vez mais confirmado na comunidade científica, e o ser humano é alvo principal devido à sua interação com o meio ambiente, possivelmente contaminado por esses micropoluentes, sendo a população sem saneamento básico a mais exposta.

A presença de desreguladores endócrinos no meio ambiente gera várias hipóteses sobre o risco ao ambiente e à saúde humana, no entanto, ainda não há uma evidência segura de que esses compostos possam aumentar o risco de câncer, mas estudos abordando os efeitos reprodutivos em humanos já foram conduzidos e comprovados, como o realizado por Stillman (1982). Stillman observou que o estrogênio sintético dietilestilbestrol havia sido prescrito a mulheres nos anos 1950-1960 que apresentaram um número significativo de anomalias nas estruturas e funções dos órgãos reprodutivos, incluindo disfunção do ciclo menstrual e infertilidade.

3.7 Efeitos dos Desreguladores Endócrinos em Organismos Aquáticos

Nos peixes, como em qualquer outro vertebrado, os estrogênios têm um papel importante no processo de reprodução e desenvolvimento incluindo maturação sexual e diferenciação sexual (YEOH *et al.*, 1996).

Purdom e colaboradores (PURDOM *et al.*, 1994) reportaram a feminização de peixes em locais próximo ao descarte de efluentes de ETEs, os autores observaram que o efeito estava relacionado com a presença de compostos estrogênicos nas amostras.

Jobling *et al.* (1998) reportaram a ocorrência de intersexualidade em peixes (*Rutilus rutilus*) coletados em rios, localizados no Reino Unido, e associaram esse evento à exposição dos peixes ao descarte de efluentes de ETEs. A intersexualidade, ou hermafroditismo, é definida pela presença simultânea de características femininas e masculinas nas gônadas dos peixes, sendo que a incidência foi observada em todos os locais de amostragem. A relação entre essa alteração morfológica causada por desreguladores endócrinos e diminuição da capacidade de reprodução, dentre elas a qualidade do esperma, foi evidenciada por Jobling *et al.* (2002).

A indução de vitelogenina (VTG) em peixes vem sendo amplamente utilizada como biomarcador de exposição estrogênica em machos ou jovens. Geralmente a VTG só é encontrada nas fêmeas, porém os peixes machos podem apresentar a VTG induzida quando expostos a ambientes contaminados com substâncias estrogênicas (SANCHEZ, 2006). Harries *et al.* (1999) utilizaram VTG como indicador de atividade estrogênica em peixes que se encontravam em estuários próximos ao descarte de efluente de duas ETEs. Em estudos anteriores, utilizando o mesmo efluente, foram detectados os hormônios naturais estrona e 17 β -estradiol. A indução de VTG foi inicialmente observada em diluições de 25% do efluente

analisado (HARRIES *et al.*, 1999). Purdon *et al.* (1994) também utilizaram VTG como bioindicador estrogênico e reportaram que espécies de peixes quando expostas ao efluente de lagoas de estabilização tinham a proteína alterada. No entanto, como não se conhecia a substância estrogênica, sugeriu-se que os dois compostos mais prováveis eram o EE2 ou alquilfenol-etoxilado (originário da biodegradação de surfactantes e detergentes durante o tratamento).

Incidências de reversão sexual foram reportadas em vários peixes localizados nos rios do Reino Unido (JOBILING *et al.*, 2002), mas as consequências na reprodução em longo prazo não foram totalmente esclarecidas. Diante do exposto, os autores Thorpe *et al.* (2009) realizaram teste crônico durante 21 dias com efluentes provenientes de ETEs, sendo realizada a contagem dos ovos produzidos diariamente. O efluente utilizado também foi caracterizado quanto à presença de E1 e E2. A partir dos dados obtidos durante o experimento os autores concluíram que ocorreu uma redução na produção de ovos (28% de redução em uma diluição de 50% do efluente e 44% para o efluente sem diluição), o que foi proporcional à quantidade de estrogênios presentes no efluente.

Documentos recentes vêm mostrando que um grande número de micropoluentes quando lançados em corpos hídricos interferem na função endócrina em uma variedade de animais, sendo o maior foco nos animais vertebrados. Informações sobre efeitos e mecanismos de ação dos desreguladores em invertebrados ainda são escassas, no entanto, os invertebrados representam mais de 95% de espécies conhecidas no reino animal e são de extrema importância no que diz respeito ao equilíbrio no ecossistema. O número limitado de estudos com invertebrados e desreguladores endócrinos pode ser devido à falta de conhecimento sobre o sistema hormonal quando comparados aos vertebrados (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003). Entretanto, nos últimos anos, grupos de pesquisa vêm avançando na compreensão dos mecanismos de ação e os efeitos sinérgicos dos desreguladores endócrinos, incluindo os estrogênios, nos invertebrados (HUTCHINSON, 2002; SEGNER *et al.*, 2003; CLUBBS e BROOKS, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2007; HAEBA *et al.*, 2008; RA *et al.*, 2008).

Santos (2011) realizou uma revisão bibliográfica sobre os efeitos causados pelo hormônio sintético EE2 em diversos organismos aquáticos e sintetizou que para concentrações menores ou iguais a $1,0 \text{ ng.L}^{-1}$, em 23 dos 41 estudos realizados por vários pesquisadores, observaram-se efeitos, como na produção de ovos, na reprodução e

desenvolvimento, na fertilização de ovos etc. Os organismos com o sistema endócrino em desenvolvimento (embriões e recém-nascidos) são mais vulneráveis à ação dos DEs.

Para avaliar o efeito dos desreguladores endócrinos nos organismos aquáticos, são realizados os testes ecotoxicológicos. Testes de ecotoxicidade são ferramentas importantes para avaliar a qualidade dos efluentes, uma vez que somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e, portanto, são insuficientes para avaliar o potencial de risco ambiental aos organismos aquáticos geralmente presentes nos corpos receptores (HERNANDO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2008).

Apesar da relevância dos testes de toxicidade, a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC- Brasil), no ano de 2008, identificou somente quatro estados brasileiros que possuem legislação específica utilizando ensaios ecotoxicológicos para controle de lançamentos de efluentes, sendo eles: São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Paraná. Na Tabela 3 estão apresentadas as legislações relacionadas com os estados citados.

Tabela 3 – Legislações adotadas por estados brasileiros que utilizam ensaios ecotoxicológicos no controle de lançamento de efluentes

Estado	Legislação
São Paulo	Resolução SMA-3/2000 da Lei 997/1976
Rio de Janeiro	Norma Técnica NT-213/1990
Santa Catarina	Portaria nº017/2002 - FATMA
Paraná	Portaria nº017/2002 - FATMA

Fonte: AUTORA, 2012

Entretanto, as Unidades Federativas que não possuem legislação para tal fim, devem seguir a Resolução Nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que em seu capítulo IV, no artigo 34, determina que o efluente não deva causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor (BRASIL, 2005). A Resolução Nº 430/2011 do CONAMA já traz como padrão de lançamento de efluentes testes ecotoxicológicos, mostrando assim a importância da realização de monitoramento dos efeitos tóxicos agudos e crônicos em organismos aquáticos nos corpos receptores (BRASIL, 2011a).

Dentre os cladóceros, as espécies do gênero *Daphnia* são as mais utilizadas em testes de toxicidade. Sua ampla distribuição geográfica, o importante papel que desempenham no zooplâncton, a reprodução partenogenética (a qual assegura uma uniformidade de resposta dos testes), o curto ciclo de vida com a produção de um alto número de neonatos, fazem os organismos deste gênero ideais para avaliação de toxicidade em nível mundial (GRANADOS *et al.*, 2004).

Daphnideos são utilizados rotineiramente em toxicologia aquática devido à sua rápida reprodução, sensibilidade aos compostos químicos e função crítica em ecossistemas de água doce (BAIRD *et al.*, 1989). Na cadeia alimentar aquática, os cladóceros desenvolvem um papel intermediário fundamental entre os consumidores primários e peixes, e mudanças no seu ciclo de vida podem desencadear respostas no ecossistema aquático (BARBOSA *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos vêm evidenciando os efeitos negativos dos desreguladores endócrinos que apresentam atividade estrogênica no microcrustáceo *Daphnia magna* (ZOU e FINGERMAN, 1997; GOTO e HIROMI, 2003; BARBOSA *et al.*, 2008) e correlacionando a presença desses compostos nos efluentes com alterações no crescimento, frequência da troca de exoesqueleto, fecundidade e fertilidade quando realizado teste crônico (MENDONÇA *et al.*, 2009) e análise de sobrevivência nos testes agudos (HERNANDO *et al.*, 2005). A troca do exoesqueleto (carapaça) nos cladóceros é controlada por hormônios esteróides chamados de ecdiesteróides (CHANG *et al.*, 1993).

3.8 Remoção de desreguladores endócrinos e do micropoluentes colesterol em sistemas de tratamento de esgoto

Processos biológicos são os mais utilizados para tratamento de esgoto sanitário, devido à possibilidade de tratamento de grande volume e elevada eficiência de remoção de matéria orgânica (SVENSON *et al.*, 2003), além do baixo custo requerido (FROEHNER *et al.*, 2011). No estado do Ceará é utilizado principalmente o processo natural de lagoas de estabilização (CAGECE, 2012), sendo que 62% dos sistemas de tratamento de efluentes sanitários correspondem às lagoas de estabilização (BRANDÃO, 2000).

Os hormônios podem ser removidos de diversas formas, sendo que os principais processos responsáveis pela remoção dos estrogênios da fase aquosa são: sorção, degradação fotolítica, biodegradação aeróbia e anaeróbia, além da biodegradação anóxica. Em ETEs, os principais processos que ocorrem para a remoção de micropoluentes são os naturais, sorção e degradação microbiológica (DEBLONDE *et al.*, 2011).

3.8.1 Sorção

Devido aos valores do log K_{ow} (coeficiente de partição octanol-água, em inglês octanol-water) dos estrogênios se encontrarem na faixa de 3,1 a 4,7, pode-se concluir que esses compostos são lipofílicos e que serão adsorvidos pela fase sólida de forma moderada a forte. Tal comportamento pode ser constatado na detecção de dois estrogênios naturais em lodo proveniente de ETEs, nas concentrações de 37 ng.g⁻¹ (estrone) e 49 ng.g⁻¹ (17 β -estradiol). O contraceptivo oral (EE2) foi detectado na concentração de 17 ng.g⁻¹ (TERNES *et al.*, 2002).

Alguns estudos vêm sendo conduzidos sobre adsorção dos estrogênios nos lodos utilizados nas ETEs visando um esclarecimento do processo de remoção e se a adsorção é a principal responsável pela eliminação desses compostos nas ETEs (SUSUKI *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2007a). Análises em sedimentos de corpos receptores também são realizadas devido ao potencial de contaminação dos micropoluentes presentes nos efluentes das ETEs, assim como sua sorção, gerando assim possíveis efeitos negativos ao ecossistema natural do aquífero (LAI *et al.*; 2000; YING *et al.*, 2003).

Segundo Clarke e Smith (2011), a escassa quantidade de estudos sobre a sorção dos hormônios esteróides em lodo gerado em ETEs se dá principalmente pela dificuldade analítica devido às baixas concentrações, além da elevada taxa de degradação.

No ano de 2009 a Agência de Proteção Ambiental Americana analisou varias amostras de lodo (n=84) e não detectou a presença do EE2 em nenhuma das amostras, apenas os esteróides campesterol, colestanol e coprostanol foram identificados (USEPA, 2009).

3.8.2 Remoção dos desreguladores endócrinos em sistemas biológicos

A biodegradação dos estrogênios ainda não é totalmente entendida, principalmente quando se trata de rotas metabólicas, vários estudos de degradação desses compostos vêm sendo realizados, mas raramente a rota metabólica é elucidada ou os produtos intermediários detectados.

Cientificamente já é aceito que o primeiro passo para a degradação do 17 β -estradiol (E2) é a oxidação do C-17 gerando um grupo cetona (C=O), sendo formado assim a estrona (E1). Entretanto, sua mineralização bem como os fatores que envolvem essa degradação ainda não são bem compreendidos (MOSCHET; HOLLENDER, 2009).

Há mais de 40 anos, Coombe *et. al.* (1966) propuseram uma rota metabólica da degradação da estrona incubando *Nocardia sp.* em um meio aeróbio onde o estrogênio era a única fonte de carbono. A degradação consistia na cisão oxidativa entre o C-4 e C-5 no anel aromático A tendo como produto de formação o ácido dicarboxílico (os carbonos citados podem ser visualizados na Figura 1, p.25). No entanto, as rotas das degradações posteriores não foram elucidadas e a formação do produto de degradação aeróbia, CO₂, não foi demonstrada. Em contrapartida, os autores Lee e Liu (2002) sugeriram que o início da degradação da E1 ocorre primeiramente no anel D (apresentado na Figura 1). Os autores estudaram a biodegradação aeróbia e anaeróbia do E2 quando exposto a um consórcio de micro-organismos isolados de uma ETE de lodos ativados e concluíram que o estrogênio natural analisado não era um composto persistente e que podia ser biodegradado por bactérias encontradas no esgoto doméstico sob condições aeróbias e anaeróbias. O estudo foi conduzido com monitoramento dos estrogênios E2 e E1, além dos metabólitos formados através de CG/MS; no entanto, não foi realizado um estudo com o lodo para comprovar se os compostos estavam sendo realmente degradados ou adsorvidos. Lee e Liu (2002) justificaram a fácil biodegradabilidade dos estrogênios devido à exposição contínua aos estrogênios naturais nas ETEs o que promoveria uma adaptação e estabelecimento de uma população bacteriana de degradação estrogênica.

Matsui *et al.* (2000) foram provavelmente os pioneiros a traçar um perfil completo ao longo do processo de tratamento de lodos ativados utilizando imunoensaio (ELISA) para avaliar a biodegradação do E2. Eles observaram um aumento na imunoreatividade ao fim do tratamento primário o qual pode ter sido causado pela biotransformação dos estrogênios conjugados em estrogênios na sua forma livre. Outros pesquisadores também atribuíram o

aumento na concentração dos estrogênios E1 e E2 durante a primeira etapa do tratamento de lodos ativados pela transformação dos estrogênios conjugados (ANDERSEN *et al.*, 2003).

Joss *et al.* (2004) avaliaram a remoção de estrogênios em vários sistemas de tratamento biológico de esgotos sanitários localizados na Alemanha, os quais tinham em seus processos a etapa de remoção de nutrientes. Os sistemas avaliados foram: tratamento convencional de lodos ativados, biorreator de membrana e reator de leito fixo, sendo encontrada uma taxa de remoção para os estrogênios variando de 77-90%. Os autores inferiram algumas observações em relação à degradação biológica de estrogênios, tais como:

- 1) A eficiência de remoção depende claramente das condições redox, sendo a máxima taxa de remoção obtida sob condições aeróbias, quando E1 foi reduzido a E2.
- 2) Ao comparar os sistemas em escala real com experimento conduzido em batelada observaram que o substrato presente no afluente influenciava a remoção, quando existe uma grande quantidade de substrato ocorre uma inibição da remoção por conta da competição entre o substrato e os estrogênios, os quais foram removidos principalmente em etapas onde havia uma menor carga orgânica (menos substrato).

Os autores Ternes *et al.* (1999a) revelaram a presença de estrogênios naturais (E1 e E2) e sintético (EE2) em esgotos brutos e tratados em ETEs localizadas na Alemanha, Brasil e Canadá. No Brasil foram encontrados estrogênios naturais e o contraceptivo sintético na ETE da Penha/RJ. As eficiências de remoção da estrona observadas foram de 67% para o efluente tratado em filtro biológico e 83% para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados. Para o 17 β -estradiol, essas taxas foram de 92 e 99,9% para o efluente tratado em filtro biológico e para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados, respectivamente. Para o estrogênio contraceptivo 17 α -etinilestradiol, as taxas de remoção na ETE foram de 64 e 78% para o efluente do filtro biológico e para o efluente do tanque de lodo ativado, respectivamente.

As concentrações dos mesmos compostos presentes nas ETEs da Alemanha foram mais baixas, no entanto a taxa de remoção foi bem menor do que as obtidas no Brasil. Os autores atribuíram à baixa eficiência de remoção devido à diferença de temperatura no período da amostragem, sendo de 2°C na Alemanha e acima de 20°C na cidade do Rio de Janeiro. A eficiência nos sistemas de tratamento está diretamente relacionada a parâmetros como a atividade microbiológica, a qual é afetada pela baixa temperatura na ETE localizada próxima a cidade de Frankfurt (TERNES *et al.*, 1999a). Os autores (Ternes *et al.*, 1999b) realizaram um estudo posterior em laboratório utilizando lodo ativado das ETEs já analisadas

e observaram que o E2 pode ser oxidado a E1 em poucas horas. E1 é então degradado após várias horas, enquanto EE2 não foi degradado, confirmando assim sua persistência.

A tecnologia de lodos ativados é uma das mais utilizadas para o tratamento de esgoto sanitário, no entanto, nem todos os compostos são eficientemente removidos ou convertidos em biomassa (JOHNSON ; SUMPSTER, 2001). A configuração de uma ETE pode ser um fator crítico na eficiência de remoção dos estrogênios. Por exemplo, projetos que contemplam a etapa de tratamento secundário biológico tendem a ter uma remoção bem maior do que uma estação de tratamento que não tenha essa etapa (BHANDARI *et al.*, 2009).

Quanto às porcentagens de remoção de lagoas aeradas resultados contraditórios são encontrados. Servos *et al.* (2005) observaram que a eficiência de remoção do E2 nas lagoas aeradas foi de 80-98%. Contudo, Hintemann *et al.* (2006) encontraram concentrações relativamente altas (15-51 ng L⁻¹) de E2 no efluente. Segundo os autores a remoção não foi eficiente possivelmente pela falta de otimização operacional das lagoas aeradas, como a bomba de aeração operada manualmente, e ausência da etapa de nitrificação.

Segundo Lintelmann *et al.* (2003), a biodegradação dos hormônios sexuais mostrou uma forte dependência em relação à adição de nutrientes. Na presença dos mesmos, estrona, estriol e estradiol foram quase totalmente degradados em 4 semanas. Ao contrário, sem a presença suficiente de nutrientes, a degradação ocorreu, porém em menor extensão. A baixa remoção em sistemas de tratamento pode estar relacionada à ausência de nutrientes, uma vez que as lipoproteínas inicialmente presentes no esgoto, principal fonte de nutrientes, foram metabolizadas pelos micro-organismos empregados no tratamento biológico (LINTELMANN *et al.*, 2003; SHIMADA *et al.*, 2003; GHISELLI, 2006).

Joss *et al.* (2004) analisaram várias ETEs na Alemanha, além de realizarem estudos em batelada incluindo análise de sorção dos estrógenos no lodo, transferência de massa, estudos de biodegradação investigando a remoção dos estrogênios em tratamentos de lodos ativados convencionais e bioreator de membrana. Em suma, os autores concluíram que a degradação dos hormônios naturais E1 e E2 foram maiores no bioreator de membrana atribuindo esse resultado a vários fatores como a idade de lodo maior e o tamanho menor dos flocos do lodo em relação aos lodos ativados. Nas ETEs de lodos ativados a taxa de remoção para os três estrogênios foi superior a 90%. Para os reatores de leito fixo a remoção de E1 foi de 75%, no entanto os autores consideraram ainda um bom desempenho, uma vez que o tempo de detenção hidráulica era de apenas 35 minutos.

A remoção de estrogênios em seis ETEs (lodos ativados) na Itália foi investigada durante 3 meses por D'Ascenzo *et al.* (2003). Além dos hormônios em sua forma livre, os autores também analisaram em sua forma conjugada. Na análise do efluente, o E2 não foi detectado nas suas formas conjugadas, mas na sua forma livre a eficiência de remoção obtida foi de 85%. Para a E1-Glucoronideo, E1-Sulfato e E1 as taxas de remoção foram de 84, 64 e 61%, respectivamente.

Carballa *et al.* (2007) obtiveram remoção de vários fármacos e produtos de higiene pessoal utilizando dois digestores comuns sob condições anaeróbias, sendo um mantido sob condições mesófilas (37°C) e outro sob condições termofílicas (55°C). Dentre os compostos analisados encontram-se os estrogênios: estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, cujas taxas de remoção alcançaram 88%. O tempo de detenção hidráulica para digestão mesófila foi de 10 dias com adaptação do lodo.

Segundo estudo sobre a biodegradação anaeróbia de estrogênios, realizado por Czajka e Londry (2006) algumas hipóteses foram levantadas, uma vez que a degradação desses compostos ainda não é muito conhecida. Em condições anaeróbias o EE2 não foi biodegradado, mesmo em condições diferentes de aceptores de elétrons. Este fato pode ser atribuído à presença do grupo etinil ($C \equiv CH$) ligado ao C-17, o qual impediria a formação do grupo cetona como foi observado no estrogênio natural E2. No entanto, o grupo hidroxila ligado ao anel aromático pode tornar esse composto mais susceptível à biodegradação que os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs). Os estudos indicaram que em condições anóxicas o mecanismo de remoção do EE2 é dominado pela sorção nos sedimentos, o que demonstra que o composto é recalcitrante nessas condições. Já o estrogênio natural (E2) foi biotransformado em estrona, estriol e 17 α -estradiol. Mesmo não ocorrendo biodegradação conclusiva o metabólito formado 17 α -estradiol apresenta menor potencial estrogênico.

No Quadro 01 estão apresentadas as concentrações e eficiências de remoção de DEs em diferentes sistemas de tratamento de esgotos.

Quadro 1– Concentrações afluentes e efluentes de estrogênios em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus índices de remoção (%)

Local de amostragem	Referência	Sistema de Tratamento ¹	Estrona (ng.L ⁻¹)			17 β -Estradiol (ng.L ⁻¹)			17 α -etinilestradiol (ng.L ⁻¹)		
			Aflu.	Efl.	% Rem	Afl.	Efl.	% Rem	Afl.	Efl.	% Rem
Alemanha	Ternes <i>et al.</i> , 1999a	LA + Fe (II)	27	70	NO	15	3	80	NR	15	NO
Brasil	Ternes <i>et al.</i> , 1999a	LA + FB	40	NR	83	21	NR	>99	NR	NR	78
Itália	Baronti <i>et al.</i> , 2000	LA	52	21	61	12	1	87	3	0,45	85
Alemanha	Johnson <i>et al.</i> , 2000	LA	31	24	23	9,69	4	59	4,84	1,40	71
Alemanha	Andersen <i>et al.</i> , 2003	LA + DESN+NI	65,7	<1	>98	15,8	<1	>98	8,2	<1	>90
Itália	D'Ascenzo <i>et al.</i> , 2003	LA	44	17	61	11	1,6	85	NR	NR	NR
Espanha	Carballa <i>et al.</i> , 2004	LA	2,40	4,40	-80	3,0	<LQ	~ 47	<LQ	<LQ	NR
Suíça	Joss <i>et al.</i> , 2004	LA + DESN+NI	7,3	8,6	-17	4,9	1,0	88	0,7	<0,5	71
Canadá	Servos <i>et al.</i> , 2005	LF	78-19	96-1	46-95	26-2,4	0,2-14,7	80-98	ND	ND	ND
Canadá	Lishman <i>et al.</i> , 2006	LF	30,2	4,5	86	8,1	<LD	100	ND	ND	ND
Brasil	Ghiselle, 2006	LA	4830	4130	14,5	6690	5560	16,9	5810	5040	13,3
França	Gomez <i>et al.</i> , 2007	LF+LM	NR	NR	NR	60	6	90	NR	NR	NR
Austrália	Ying <i>et al.</i> , 2008	LAN+LF	35,5	34,2	0,87	7,4	3,9	47	0,8	0,6	25
Inglaterra	Kanda e Churchley, 2008	LA	44,7	1,22	97,3	2,9	0,23	99,2	0,65	0,63	3,2
Austrália	Coleman <i>et al.</i> , 2010	LE	NR	NR	75	ND	ND	ND	ND	ND	ND
China	Chang <i>et al.</i> , 2011	LA	9,9	1,87	81	1,71	0,4	76	ND	ND	ND
Coréia	Sim <i>et al.</i> , 2011	LA	29	19	35	17	<LD	100	ND	ND	ND
Brasil	Froehner <i>et al.</i> , 2011	LAN+LF+LM	1380	ND	ND	1450	630	56,5%	600	ND	ND
Canadá	Atkinson <i>et al.</i> , 2012	LA+ Rem P + Cl	104 ²	370	-257	66,9	<LD	NR	5,7	9,8	-73,1
Brasil	Brant, 2012	UASB	NR	NR	NR	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Reino Unido	Paterakis <i>et al.</i> , 2012	Reator anaeróbio	158 ³	NR	79	9	NR	-324	18	NR	34

Fonte: AUTORA, 2012.

Legenda: **LA**: Lodos Ativados; **LA + DESN+NI**: Lodos Ativados com etapa de desnitrificação e nitrificação; **LA+ Rem P + Cl**: Lodos Ativados com etapa de remoção de fósforo seguido da etapa de cloração (eventualmente); **LE**: Lagoa de Estabilização; **LF**: Lagoa Facultativa; **LD**: Limite de Detecção; **LQ**: Limite de Quantificação; **LAN**: Lagoa Anaeróbia; **LM**: Lagoa de Maturação; **ND**: não detectado; **NR**: não reportado; **NO**: não ocorreu remoção; **LA + Fe (II)**: LA com adição de cloreto ferroso; **LA+FB**: LA seguido de filtro biológico.

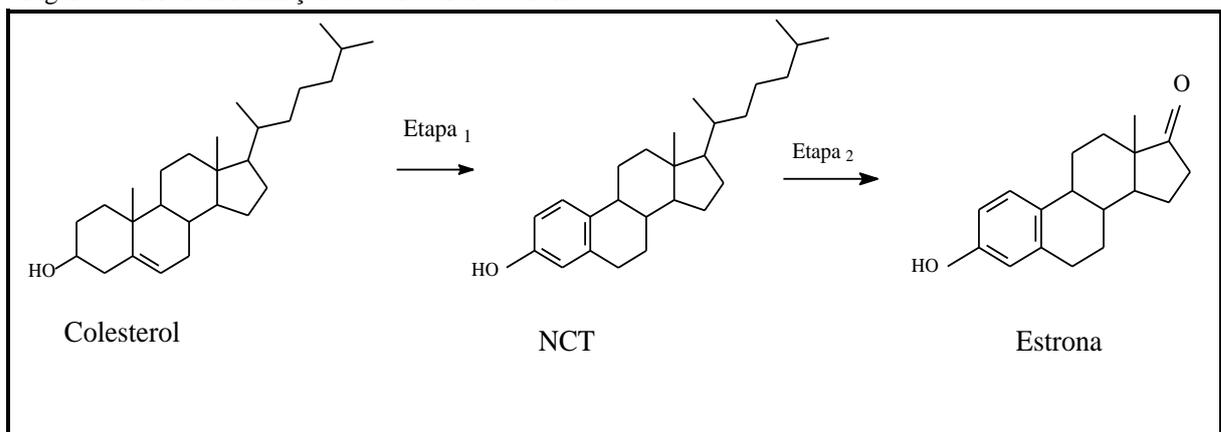
¹Etapas predominantes na remoção ²Concentrações máximas ³ unidade= $\mu\text{g kg}^{-1}$

3.8.3 Remoção do micropoluinte colesterol em sistemas biológicos

O colesterol pode ter sua origem no corpo humano tanto natural como antrópica, sendo precursor das três principais classes de hormônios, dentre eles os hormônios reprodutores, como a estrona e o estradiol. O colesterol é primeiro convertido em progesterona, que é então transformada em andrógenos (androstenediona e testosterona). Estes são então convertidos em estrógenos, dos quais o 17β - estradiol é o mais potente (ECKERT *et al.*, 2008).

Poucas pesquisas vêm sendo realizadas visando um melhor esclarecimento da biotransformação do composto colesterol durante o tratamento de esgoto. Niven *et al.* (2001) realizaram uma pesquisa com o objetivo de examinar se a biotransformação do colesterol poderia gerar como subproduto o estrogênio estrona, motivado por um estudo realizado anteriormente por Afonso *et al.* (1966 *apud* NIVEN *et al.*, 2001). Os autores concluíram que um composto análogo ao colesterol, 19-norcolest-1,3,5 (10)-trien-3-ol (NCT), poderia ser convertido em estrona pela bactéria aeróbia *Nocardia restrictus*, no entanto, os pesquisadores Niven *et al.* (2001) não observaram a transformação do colesterol ao NCT, e sim sua mineralização quase completa e formação de alguns metabólitos como o colestadienol. Na Figura 5 são apresentadas as estruturas dos compostos colesterol, NCT e estrona.

Figura 5 – Biotransformação do colesterol a estrona



Fonte: NIVEN *et al.*, 2001.

Etapa 1) hipotética; Etapa 2) biotransformação do NCT à estrona

3.9 Métodos Analíticos utilizados para determinação de DEs

A detecção e quantificação de estrogênios esteróides em matrizes ambientais complexas como esgoto doméstico são procedimentos complexos e dispendiosos, e uma prática ainda muito difícil de tornar-se uma análise de rotina para ser exigida pelos órgãos de fiscalização ambiental.

Atualmente existem disponíveis na literatura uma grande variedade de procedimentos analíticos que vem sendo empregados na análise de amostras ambientais como água, solo, sedimento e ar. Dentre as técnicas utilizadas para a determinação de compostos em nível de traços, na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ até ng.L^{-1} , a grande maioria emprega técnicas cromatográficas para a separação de analitos de interesse, sendo utilizados equipamentos que apresentam elevada seletividade e baixo limite de detecção.

As amostras ambientais são consideradas matrizes complexas devido à presença de uma infinidade de compostos que podem interferir na análise. Além disso, não existe uma metodologia padronizada para o desenvolvimento do procedimento analítico, podendo este ser selecionado de acordo com a infraestrutura do laboratório.

Devido à inexistência de uma metodologia padrão alguns documentos podem ser utilizados para a validação do método analítico (BRASIL, 2003; INMETRO, 2006; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

Alguns fatores devem ser levados em consideração ao selecionar o método de análise, como: disponibilidade, adaptabilidade e capacidade total da técnica instrumental escolhida para a quantificação, tempo de análise e custos envolvidos, seletividade, detectabilidade, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade, robustez, faixa de aplicação, dentre outros (GHISELLI, 2006).

As técnicas mais comumente reportadas para análise de hormônios sexuais são: Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG/EM) (MOL *et al.*, 2000; BRAUN *et al.*, 2003; GHISELLI, 2006), Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa no modo *tandem* (CG/EM/EM) e Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa (CL/EM) (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004; MOREIRA, 2008).

Atualmente, a técnica de cromatografia gasosa (CG) vem sendo menos utilizada do que cromatografia líquida (CL) em análise de estrogênios devido à dificuldade na etapa de preparação da amostra incluindo a necessidade de derivatização, no entanto CG apresenta uma alta resolução, um menor custo operacional e uma reduzida quantidade de geração dos resíduos proveniente do uso de solventes (TOMSÍKOVÁ *et al.*, 2012). Cromatografia gasosa

acoplada à espectrometria de massa (MS) é uma técnica escolhida para análise de muitos compostos orgânicos prioritários, geralmente (semi-) voláteis ou de baixa polaridade. Um grande número de aplicações da CG/MS é reportado, apresentando como resultado eficientes separações juntamente com a informação gerada pelo espectro e sensibilidade satisfatória proveniente do espectrômetro de massas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

De forma a garantir a detecção de estrogênios em amostras ambientais é necessário o desenvolvimento de uma metodologia altamente sensível e seletiva utilizando por exemplo CG/MS, a técnica CG/MS/MS também é indicada, no entanto De Mes (2007) ao analisar as duas tecnologias não percebeu aumento da sensibilidade ao investigar estrogênios em águas negras tratadas anaerobiamente.

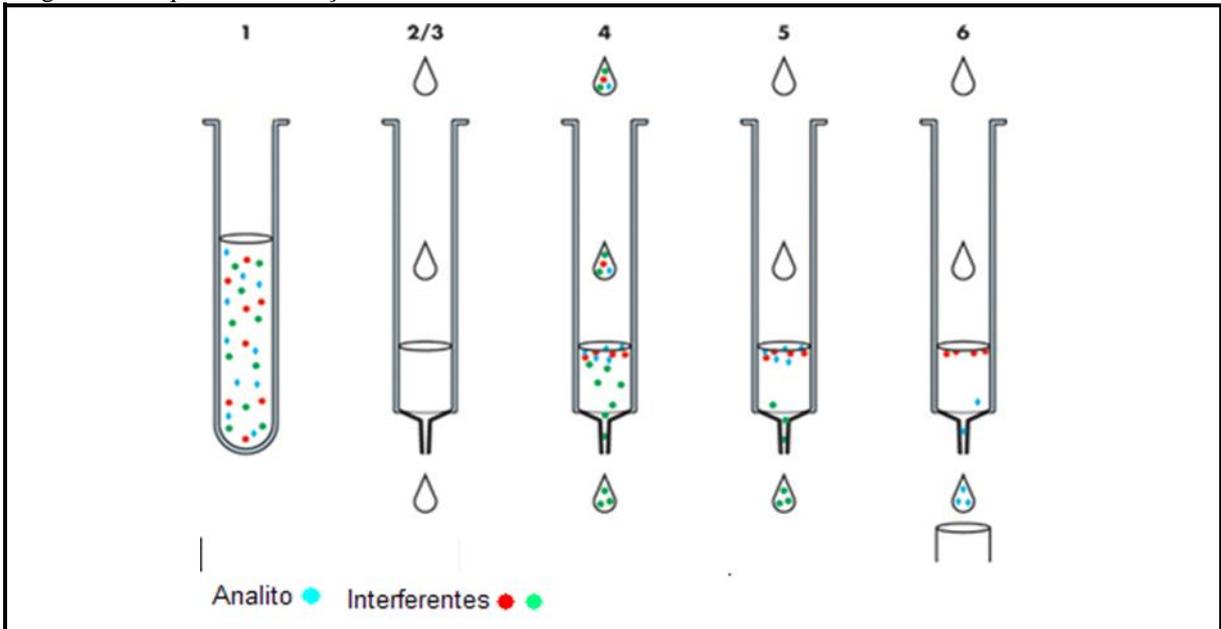
A detecção de estrogênios por CL/MS (HPLC/MS) em amostras ambientais é bastante utilizada devido à sua sensibilidade e especificidade, além de não ser limitada pela não volatilidade e alto peso molecular dos analitos em questão (LABADIE; HILL, 2007; LOPEZ DE ALDA e BARCELÓ, 2000). Porém, o uso de CL/MS como uma ferramenta analítica não está livre de dificuldades (KOH *et al.*, 2007). O efeito matriz que ocorre na CL pode resultar na supressão dos íons e assim aumentar a ocorrência de resultados falso positivo, o efeito é causado pela coeluição dos picos de interesse com os componentes da matriz (KUSHNIR *et al.*, 2011).

Infelizmente, os métodos utilizando espectrometria de massa estão associados à instrumentação de preço elevado e requerimento de técnicos treinados, o que impede a aplicação desses métodos em análises rotineiras (HINTEMANN *et al.*, 2006).

3.9.1 Extração em fase sólida (SPE)

Devido às baixas concentrações dos analitos encontrados nas matrizes ambientais é necessária a realização da etapa de pré-concentração da amostra, sendo a extração em fase sólida (SPE) a técnica mais utilizada para concentração dos estrogênios. Na Figura 6 está apresentado o esquema da SPE e suas etapas durante a concentração do analito.

Figura 6 – Esquema da extração em fase sólida.



Fonte: AUTORA, 2012.

Legenda: 1) amostra; 2 e 3) condicionamento do cartucho; 4) concentração dos analitos através da passagem da amostra; 5) remoção dos interferentes (*Clean up*); 6) eluição do analito de interesse.

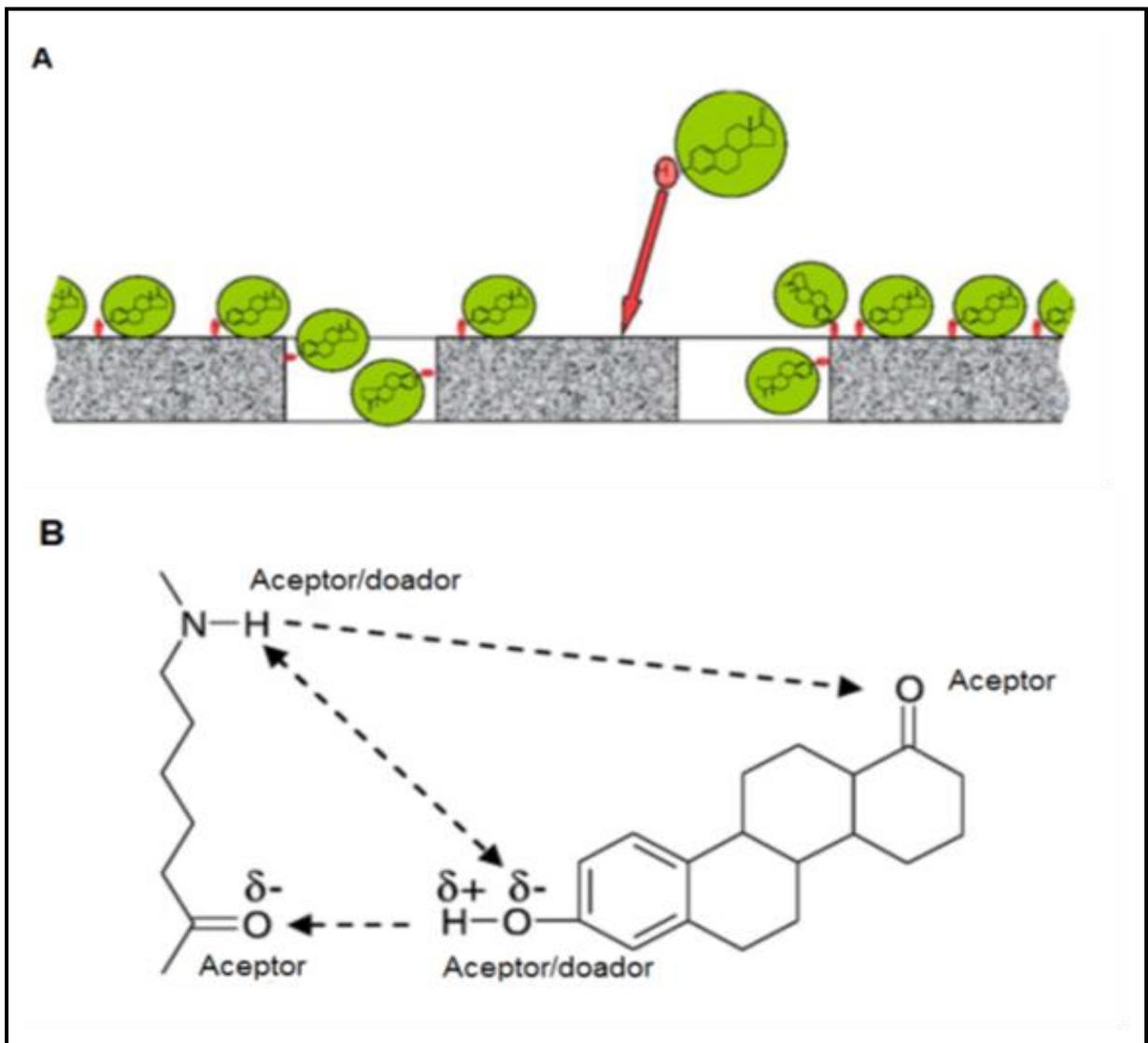
A escolha do cartucho apropriado para a realização da extração é uma etapa essencial no desenvolvimento analítico, o qual deve ser selecionado de acordo com as propriedades físico-químicas do analito de interesse. Vários materiais são utilizados como adsorvente, sendo dividido em três principais grupos: sílica, poliméricos e carbono ativado (SALVADOR *et al.*, 2007). Um dos materiais bastante empregado na concentração de estrogênios é a sílica modificada octadecilsilano (C-18) (KELLY, 2000; INGRAND *et al.*, 2003; GIROTTO *et al.*, 2007). Outro material indicado, inclusive pelo método 1694 (USEPA, 2007) e bastante empregado para esses analitos é o copolímero, produzido a partir dos monômeros: hidrofílico (N-vinilpirrolidona) e lipofílico (divinilbenzeno) disponível comercialmente nos cartuchos Oasis HLB® da Waters (QUINTANA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; PEDROUZO *et al.*, 2009). O cartucho Strata X® é similar ao Oasis HLB® (Waters). O cartucho Strata X® é composto por um monômero contendo dois grupos diferentes, um hidrofílico composto pelo grupo pirrolidona e outro lipofílico composto pelo grupo benzila. Sendo assim, ele tem a capacidade de reter analitos polares e não-polares (QUEIROZ, 2011).

O desenvolvimento da etapa de SPE muitas vezes é realizada com processos de erro-tentativas visando sua otimização, a qual é baseada na interação das propriedades físico-químicas e termodinâmicas entre material adsorvente, analitos e solventes de eluição (BIELICKA-DASZKIEWICZ e VOELKEL, 2009).

Os diferentes mecanismos de retenção ou eluição ocorrem devido às forças intermoleculares entre o analito, os sítios ativos na superfície do adsorvente e a fase líquida ou matriz (HUCK e BONN, 2000). A interação entre a superfície dos analitos e o sorbente é forte, mas reversível. As interações típicas que ocorrem são hidrofóbicas (forças de *van der Waals*), polar (ponte de hidrogênio e forças dipolo-dipolo) ou troca iônica (MASQUÉ *et al.*, 1998).

A adsorção é reconhecidamente o mecanismo de retenção com maior ocorrência entre os micropoluentes e as membranas poliméricas, o mesmo pode ser visualizado na Figura 7a. As características deceptor e doador de átomos de hidrogênio podem ser as que mais afetam a interação dos analitos e polímeros, em particular a habilidade de formar pontes de hidrogênio, a qual é apresentada na Figura 7b (SCHÄFER *et al.*, 2011).

Figura 7 – Mecanismo de adsorção para retenção de micropoluentes em membranas poliméricas



Fonte: Adaptado de SCHÄFER *et al.*, 2011

Além da escolha do material adsorvente a ser utilizado na SPE um outro parâmetro essencial que deve ser otimizado é a faixa de pH da matriz a ser analisada. Conforme relatado em estudos anteriores (QUINTANA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004a) a metodologia cromatográfica deve ser avaliada em relação ao ajuste de pH da amostra, uma vez que a retenção das substâncias húmicas presentes na amostra nos cartuchos poderia ser influenciada pelo pH da matriz. Quintana *et al.* (2004) observaram um aumento na performance da extração em valor de pH neutro, obtendo-se conseqüentemente um melhor cromatograma para os compostos estudados, dentre eles os estrogênios. Liu *et al.* (2004a) realizaram um estudo analisando o efeito da variação do pH na etapa de extração em fase sólida, analisando as três faixas de pH (ácido, neutro e básico) e concluíram que não havia diferença significativa entre a faixa de pH ácido (4,2) e neutro (8,0), no entanto vários pesquisadores realizam essa etapa anterior a SPE (de GRAAFF *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2011; SIM *et al.*, 2011; VEGA-MORALES *et al.*, 2010; BRAUN *et al.*, 2003). Vega-Morales *et al.* (2010) afirmam que a acidificação para $\text{pH} < 3$ previne a perda dos analitos por reações abióticas, como a hidrólise, e degradação biológica. Devido às essas divergências reportadas na literatura científica não há uma faixa de pH estabelecida.

Geralmente a eficiência do material adsorvente frente à concentração dos compostos traços é dada em termos de recuperação, a qual é determinada mediante a adição de uma concentração de analito na matriz permitindo ao analista determinar se há efeito matriz na amostra analisada (DEAN, 1998). A faixa esperada de concentração (recuperação) depende da matriz amostral, do procedimento de recuperação utilizado e da concentração dos analitos (AOAC, 1998). Na Tabela 4 são apresentados valores de recuperação estimados em função da concentração do analito na amostra.

Para a eluição dos analitos do material da fase sólida, diversos solventes podem ser utilizados, sendo os mais comuns metanol, acetona, acetonitrila ou ainda uma mistura dos mesmos.

Tabela 4 – Recuperação de analitos em diferentes concentrações

Concentração do analito (%)	Relação do analito	Unidade	Média de recuperação (%)
100	1	100%	98-102
≥10	10 ⁻¹	10%	98-102
≥1	10 ⁻²	1%	97-103
≥0,1	10 ⁻³	0,1%	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10ppm	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10ppb	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	40-120

Fonte: AOAC (1998) *apud* HUBER (2007).

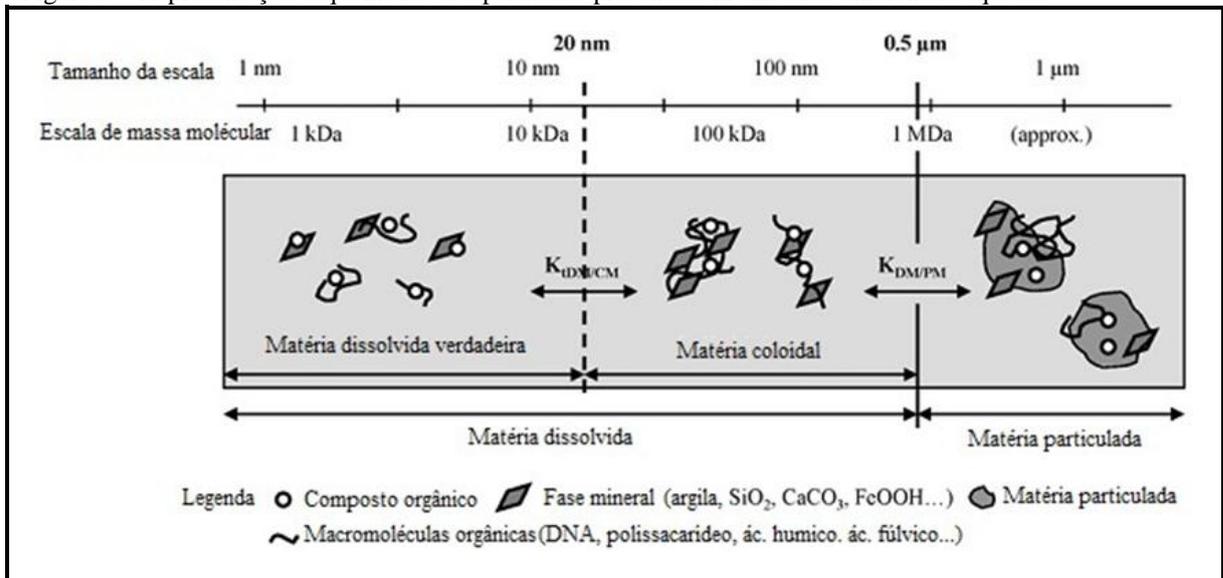
Legenda: ppm : mg L⁻¹; ppb : µg L⁻¹

Uma das grandes desvantagens da SPE é o volume de amostra requerida para a concentração dos analitos, além do tempo demandado. Por exemplo, para uma concentração de 1000 vezes, é necessário um volume de 1 L e o tempo de extração pode chegar a 3 horas (WANG *et al.*, 2005).

Em amostras ambientais aquosas, as macromoléculas orgânicas, sendo 80-90% compostas de ácidos húmicos, podem ser adsorvidas no material do cartucho. A presença dessas moléculas pode influenciar de forma negativa a eficiência da SPE, a interação dessas moléculas dissolvidas diminui a disponibilidade dos sítios ativos do material. Este efeito negativo vem sendo estudado e alguns autores afirmam que este fenômeno pode ser evitado pela adição de modificadores orgânicos, como agentes surfactantes (ZHANG *et al.*, 2006) dentre eles o isopropanol, uma vez que este composto pode se ligar à matéria orgânica natural (JEANNEAU; FAURE; JARDÉ, 2007). As propriedades químicas de agentes surfactantes conferem a capacidade de solubilizar compostos orgânicos hidrofóbicos (WEST; HARWELL, 1992).

Na Figura 8 estão apresentados os tipos de matéria orgânica natural interagindo com micropoluentes orgânicos. Esse tipo de matéria é responsável por transportar micropoluentes hidrofóbicos aos sedimentos através de fracas interações (MAGEE *et al.*, 1991).

Figura 8 – Representação esquemática das partículas presentes em amostras ambientais aquosas



Fonte: Adaptado de JEANNEAU; FAURE; JARDÉ, 2007

3.9.2 Derivatização

A derivatização é uma reação química utilizada para alterar compostos gerando novos produtos com melhores propriedades cromatográficas, sendo uma ferramenta muito utilizada para detecção de compostos orgânicos em amostras complexas (SCHUMMER *et al.*, 2009). A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) apresenta um perfil com várias vantagens, no entanto, muitos DEs polares requerem a derivatização para uma adequada detecção (BOWDEN *et al.*, 2009).

O pré-requisito principal para análise por cromatografia gasosa (CG) é que o analito de interesse seja volátil e termicamente estável. Como a maioria dos compostos orgânicos apresenta baixa volatilidade, incluindo estrogênios, a derivatização deve ser realizada anteriormente à separação cromatográfica (GOMES *et al.*, 2003).

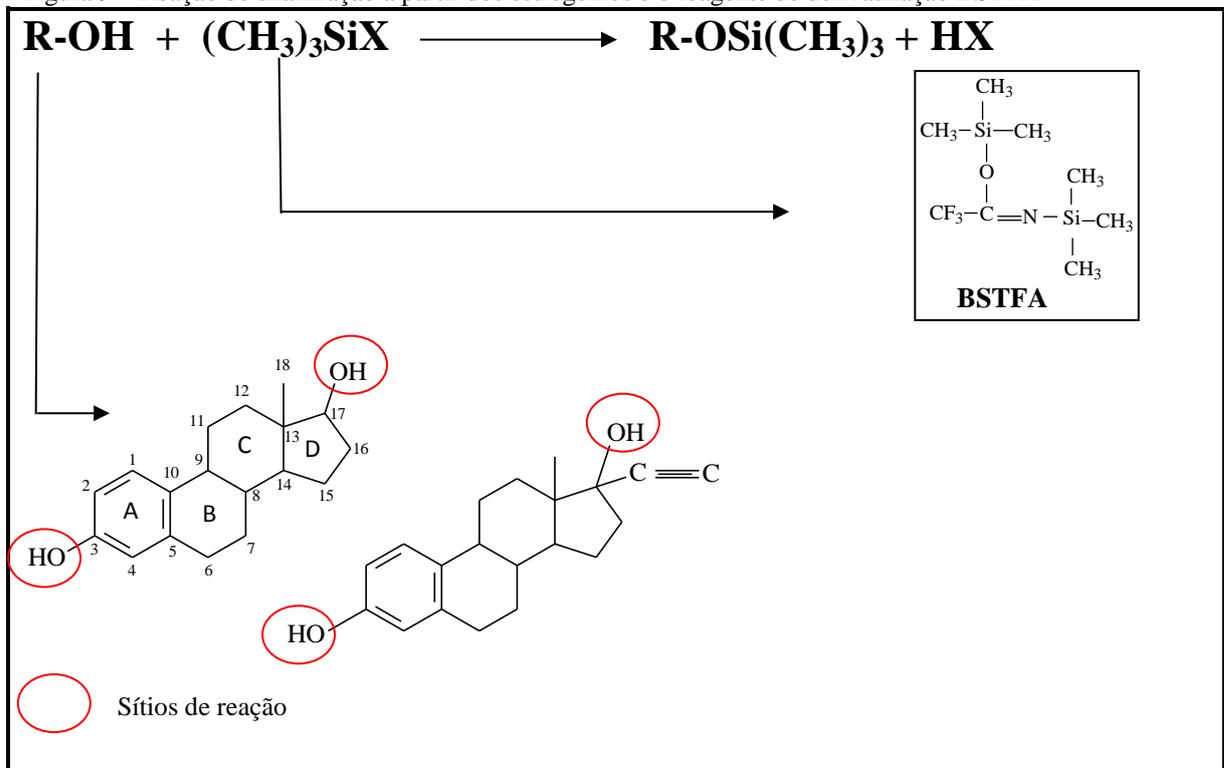
O reagente utilizado na etapa de derivatização deve ser escolhido de acordo com o grupo funcional do analito de interesse. O tipo de reagente selecionado pode influenciar a análise cromatográfica, a resposta do detector assim como a estabilidade da amostra (TERNES; JOSS, 2006).

A etapa de derivatização é geralmente realizada por reações de substituições no grupo polar do composto, aonde ocorrem as mais comuns reações de alquilação, acetilação e silanização, sendo esta provavelmente a técnica mais utilizada. Nas reações de silanização, o hidrogênio mais instável de ácidos, alcoóis, aminas, amidas ou cetonas e aldeídos é substituído pelo grupo trimetilsilil (TMS). Normalmente não há necessidade de uma etapa de purificação e o produto derivatizado pode ser injetado diretamente no cromatógrafo gasoso (SCHUMMER *et al.*, 2009).

Uma grande variedade de reagentes silanizantes está disponível para transferir o grupo TMS ao analito, sendo os mais comumente utilizados para derivatização de estrogênios: N, O - bis - (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA). Ambos reagentes já foram utilizados com sucesso em análises de estrogênios em matrizes ambientais (GHISELLE, 2006; BILLA, 2005; LIU *et al.*, 2004b; QUINTANA *et al.*, 2004).

Na Figura 9 está apresentada a reação geral de silanização dos estrogênios utilizando BSTFA como reagente silanizante.

Figura 9 – Reação de silanização a partir dos estrogênios e o reagente de derivatização BSTFA



Fonte: MOREIRA, 2008.

No entanto, essa etapa apresenta algumas desvantagens, como: requerimento de um tempo maior de análise, podendo chegar a 3 horas de reação, dependendo do reagente empregado (GHISELLE, 2006), redução da recuperação do analito e ainda pode promover a conversão parcial ou total de um estrogênio, como EE2 em E1 (LERCH; ZINN, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os padrões dos estrogênios utilizados na pesquisa foram estrona - E1 (99%), 17 β estradiol - E2 (98%), 17 β estradiol- 17 acetato - E2-17A (98,8%) e 17 α -etinilestradiol - EE2 (99,4%), adquiridos da Sigma-Aldrich. Como reagentes derivatizantes foram utilizados o BSTFA (N-O-Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida) de fórmula molecular $C_8H_{18}F_3NOSi_2$, e MTBSTFA+1% TBDMCS(N-Terc-Butildimetilsilil-N-metilfluoracetamida) de fórmula molecular $C_9H_{18}F_3NOSi$ adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes acetona, metanol e hexano utilizados foram de grau HPLC (Vetec).

4.1.1 Material utilizado para etapa de filtração da amostra e do eluato

Durante a etapa de filtração da amostra foi utilizado um sistema com bomba de vácuo e papel de filtro de fibra de vidro com diâmetro 47 mm e porosidade 0,45 μm (*Millipore*). Posteriormente, foi adotado um sistema manual de filtração com suporte do tipo *swinnex* em polipropileno, 47 mm de diâmetro. Os sistemas podem ser visualizados na Figura 10.

Figura 10 – Sistemas de filtração da amostra



Fonte: AUTORA, 2012

Para a etapa de microfiltração do eluato (extrato obtido após eluição e derivatização) foi utilizado suporte para filtração *swinnex* em polipropileno (13 mm de diâmetro) acoplado com membrana FG (fluoropore) em PTFE, 0,2 µm de poro e 13 mm de diâmetro, ambos da *Millipore*. O material citado pode ser visualizado na Figura 11.

Figura 11– Material utilizado para microfiltração do eluato

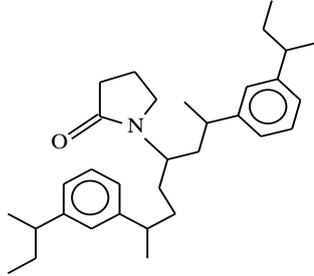
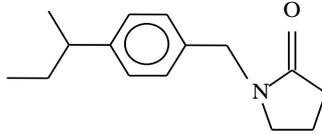


Fonte: AUTORA, 2012

4.1.2 Material utilizado na etapa de extração em fase sólida (SPE)

Na Tabela 5 estão apresentados os cartuchos empregados na etapa de extração em fase sólida (SPE).

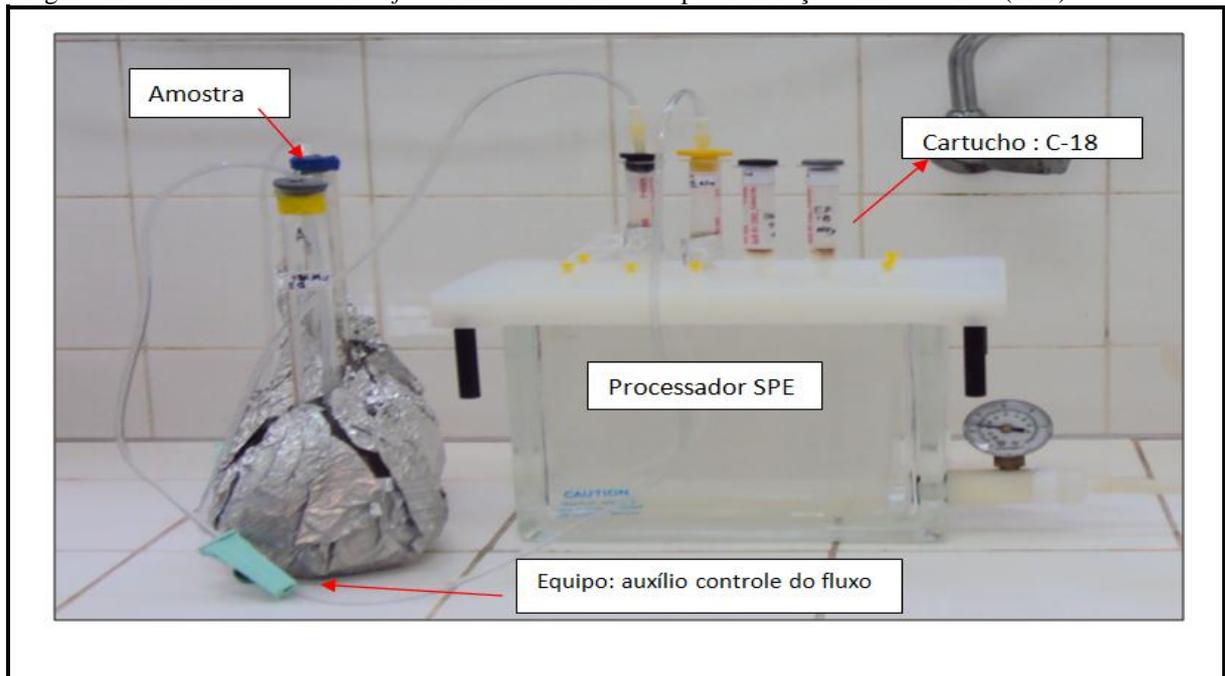
Tabela 5 – Características dos cartuchos empregados na etapa de extração em fase sólida

Sorbente	Fase Estacionária	Grupo Funcional	Fabricante
DSC-18 (500mg/6 mL)	Octadecilsilano (sílica modificada): fase reversa	$\text{—Si—(CH}_2\text{)}_{17}\text{CH}_3$	Supelco
Oasis® HLB (200 mg/6mL)	Polímero (divinilbenzeno-N-vinilpirolidona): fase reversa		Waters
Strata™-X (200 mg/6mL)	Polímero (estireno-divinilbenzeno modificado com butirrolactona): fase reversa		Phenomenex

Fonte: AUTORA, 2012.

Para a realização da etapa de extração dos analitos foi empregado o processador manual *Vacuum Manifold* (modelo Speed Mate 12; da marca Applied Separations), conforme mostrado na Figura 12, o qual era conectado a uma bomba de vácuo (modelo VP-24; marca MFS) que mantinha um fluxo médio de 1,5 - 2 mL min⁻¹. O fluxo foi mantido com o auxílio de equipamentos de uso hospitalar (marca: Embramed).

Figura 12 – Sistema *Vacuum Manifold* utilizado durante a etapa de extração em fase sólida (SPE)



Fonte: AUTORA, 2012.

4.1.3 Material utilizado para detecção dos desreguladores endócrinos

A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa com amostrador automático (modelo: FOCUS DSQII-230ST; marca: THERMO SCIENTIFIC), conforme mostrado na Figura 13. O processador de dados utilizado foi o *software X-Calibur 2.0.7*. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna capilar OV-5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano) da marca Ohio Valley com dimensões 30m x 0,25mm x 0,25 μ m. A coluna foi posteriormente substituída pela coluna SLB™-5MS (polímero silfenileno – equivalente em termos de polaridade a OV-5MS), com mesmas dimensões citadas, obtida da marca Supelco. A substituição foi realizada devido ao sangramento (*column bleed*) da coluna, causado geralmente em consequência da inevitável degradação térmica do material polimérico, a qual ocorre com o aumento da temperatura da mesma assim como com o acúmulo de compostos não voláteis na coluna (BARRY e GROB, 2007). A fase móvel ou gás de arraste utilizado foi o gás Hélio adquirido com 99% de pureza (White Martins).

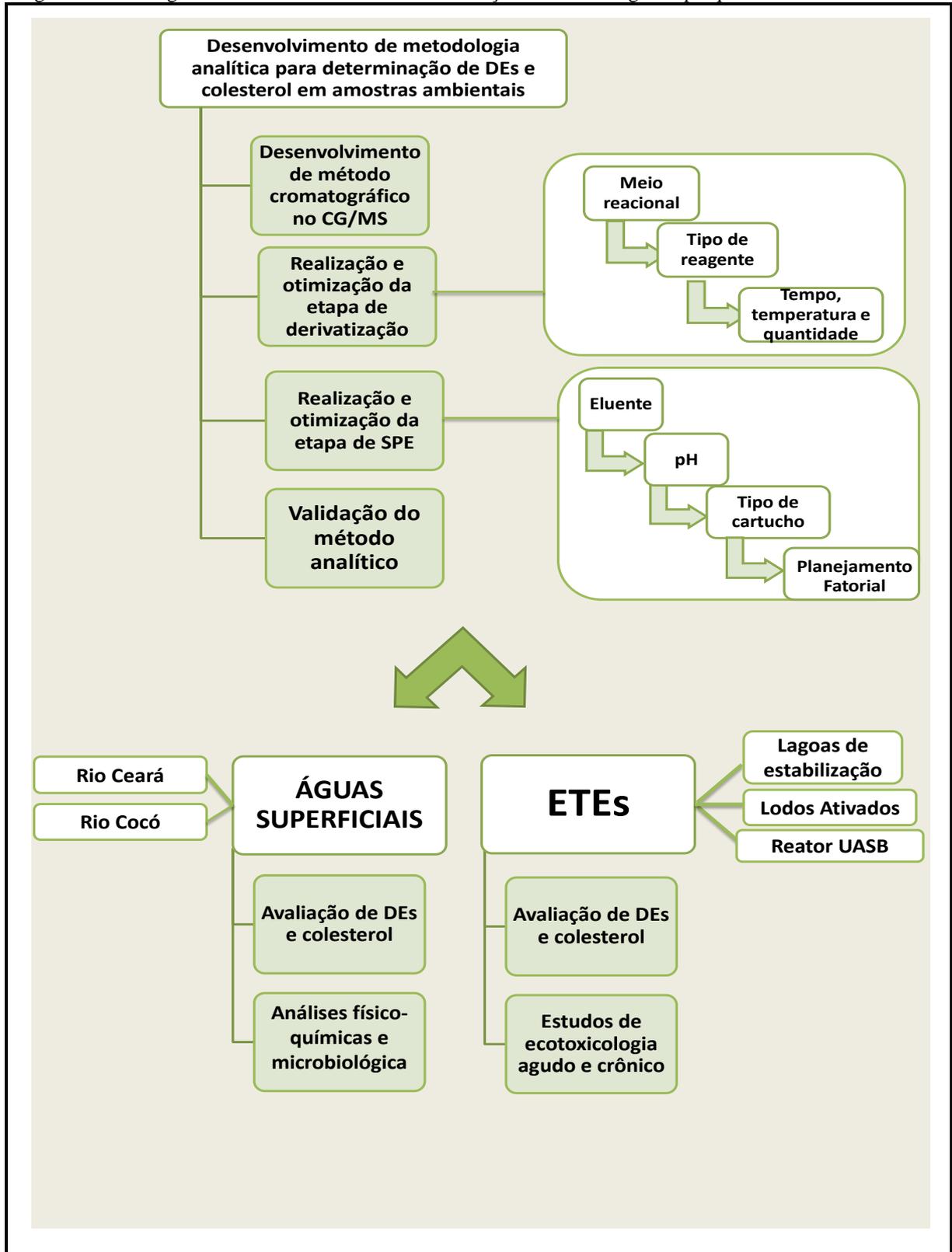
Figura 13 – Equipamento CG/MS (Thermo Scientific)



Fonte: AUTORA, 2012.

Visando um melhor esclarecimento da metodologia empregada na pesquisa é apresentado na Figura 14 o fluxograma da estrutura utilizada para a elaboração da metodologia.

Figura 14 – Fluxograma da estrutura utilizada na elaboração de metodologia da pesquisa



4.2 Desenvolvimento do Método Analítico

As condições cromatográficas foram baseadas em métodos publicados na literatura científica (TERNES *et al.*, 1999a; MOL *et al.*, 2000; SHIMADA *et al.*, 2001; GHISELLI, 2006). Foram realizados vários testes a fim de otimizar as condições para análise dos compostos em estudo, uma vez que não existe um método padronizado. As condições cromatográficas, tais como rampa de aquecimento, temperaturas de injeção, linha de transferência e fonte de íons, modo de análise do MS (scan/sim), foram otimizadas visando a melhor resolução dos picos dos analitos no menor tempo de corrida, sem interferências de outros compostos presentes na matriz avaliada (CARNEIRO, 2012).

Devido à substituição do material da coluna as resoluções dos compostos E1 e E2 foram calculadas a partir da Equação 1. O cálculo de resolução é realizado para garantir que os picos não estejam coeluidos.

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 \times (W_1 + W_2)} \quad (1)$$

Onde:

t_R : tempo de retenção do composto (min);

W : largura do pico na base (min).

Maiores valores de resolução indicam melhor separação:

$R_s=1$, os dois picos são razoavelmente separados;

$R_s=1,25$, é suficiente para fins quantitativos;

$R_s>1,5$, indica separação completa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Para calcular a eficiência da coluna foi utilizado o número de pratos teóricos (N), conforme Equação 2. Quanto maior o valor de N , mais eficiente será a coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2)$$

As condições utilizadas para identificação e quantificação dos estrogênios utilizando CG/MS estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições cromatográficas utilizadas na análise de estrogênios com equipamento CG/MS

Parâmetros do GC	
Gás carreador	Hélio
Vazão do gás de análise	1,2 mL min ⁻¹
Volume de injeção	1 µL
Modo de injeção	Splitless
Temperatura do injetor	250°C
Temperatura da interfase	290°C
Temperatura da fonte de íons	290°C
<i>Rampa de Aquecimento:</i>	
Temperatura Inicial	50°C
	40°C/min até 150°C
Programa de Temperatura	40°C/min até 270°C (1 min)
	10°C/min até 280°C (5 min)
	10°C/min até 290°C (5 min)
Parâmetros do MS	
Calibração com PFTBA	Modo automático
Método de ionização	Impacto de elétrons (EI+)
Relação m/z inicial	50
Relação m/z final	650
Aquisição de dados	0,50 s
Modo aquisição dados	FULL SCAN
Energia	+70 eV

Fonte: AUTORA, 2012

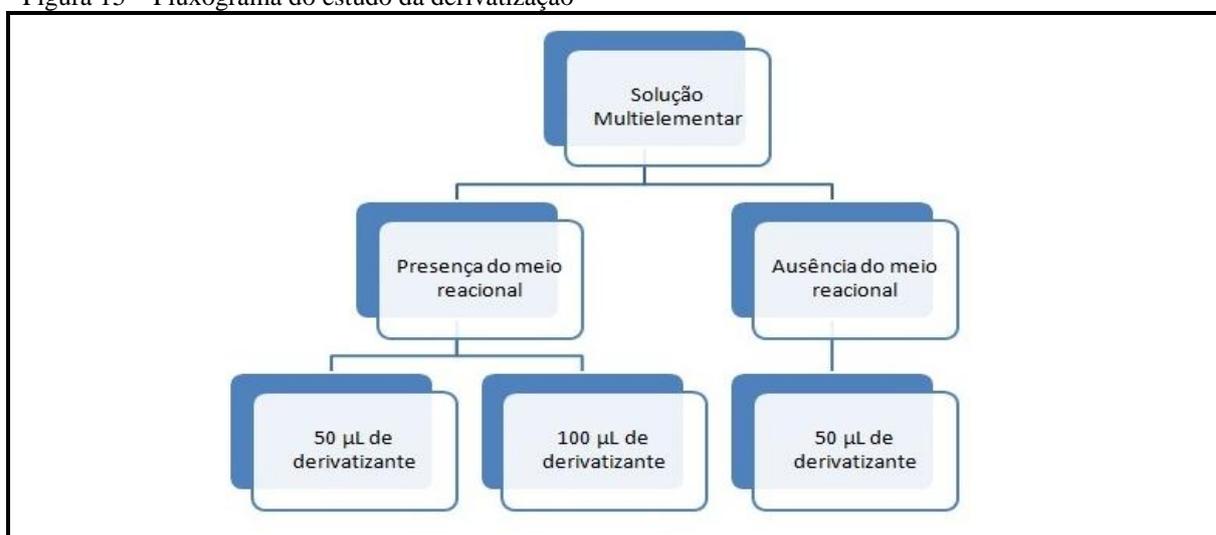
As análises quantitativas foram realizadas empregando-se o método do padrão externo. Trabalhou-se com solução-padrão contendo analitos em concentrações variadas, obtidas através de diluições sucessivas das respectivas soluções-padrões derivatizadas. Estas soluções foram injetadas em triplicata, sendo a média utilizada para obtenção das curvas analíticas através da regressão linear (área *versus* concentração). O composto 17 α -etionilestradiol foi analisado individualmente devido a sua derivatização incompleta e possível transformação em estrona (STRECK, 2009; SHAREEF *et al.*, 2006; LABADIE *et al.*, 2005).

4.3 Estudos de Derivatização

Durante o estudo da etapa de derivatização foram analisados diferentes meios reacionais, quantidade de derivatizante e tempo de reação. A metodologia adotada por Ghiselli (2006) foi insatisfatória para derivatizar os esteróides devido à presença do meio reacional. Portanto, foi avaliada outra metodologia, sem a presença do meio reacional durante a reação de derivatização (BILA, 2005; LIU *et al.*, 2004b).

Inicialmente, foram analisados os tipos de meio reacional empregados durante a etapa de derivatização, em que os solventes avaliados foram o acetato de etila (EtOAC) e o metanol (MeOH). Também foi realizada a análise da ausência do meio reacional, em que a solução multielementar foi completamente evaporada em estufa à temperatura de 45°C e, posteriormente, adicionado o reagente de derivatização. O reagente derivatizante utilizado nessa etapa foi o MTBSTFA+1% TBDMCS. Na Figura 15 está apresentado o fluxograma resumido do estudo de derivatização realizado.

Figura 15 – Fluxograma do estudo da derivatização



Fonte: AUTORA, 2012

Após a investigação do efeito da presença ou ausência do meio reacional, foi realizado um estudo de comparação dos dois tipos de derivatizantes, BSTFA e MTBSTFA +1% TBDMCS, sob duas condições distintas: 100 µL, 75 °C, 3 horas (condição A); e 50 µL, 60 °C, 30 min (condição B). Os frascos foram tampados e levados a banho-maria. Na Tabela 7 estão apresentadas as duas condições utilizadas para os dois reagentes. Foram analisadas como respostas as áreas dos picos nas duas condições para seleção do silanizante.

Tabela 7 – Condições utilizadas para avaliação dos reagentes derivatizantes BSTFA e MTBSTFA+1%TBDMCS

Condição	Volume (µL)	Temperatura de reação (°C)	Tempo de reação	Referência
A	100	75	3 horas	Mol <i>et al.</i> , 2006
B	50	60	30 minutos	Liu <i>et al.</i> , 2004

Fonte: AUTORA, 2012

Após a seleção do reagente derivatizante, as condições analíticas para a etapa de derivatização foram otimizadas pelo planejamento fatorial com três fatores (2^3) e triplicata no ponto central (apresentado em negrito), de forma randomizada. Os parâmetros otimizados foram: volume do derivatizante (25-75 µL), temperatura da reação (40-80°C) e tempo de duração (15-45 min). O *software* utilizado durante o estudo foi o *Statgraphics® Centurion XV*. O planejamento do experimento pode ser visualizado na Tabela 8.

Tabela 8 – Planejamento fatorial de otimização da etapa de derivatização

Bloco	Volume (µL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	50	60	30
2	25	40	45
3	75	80	15
4	75	40	15
5	25	80	15
6	25	40	15
7	50	60	30
8	75	40	45

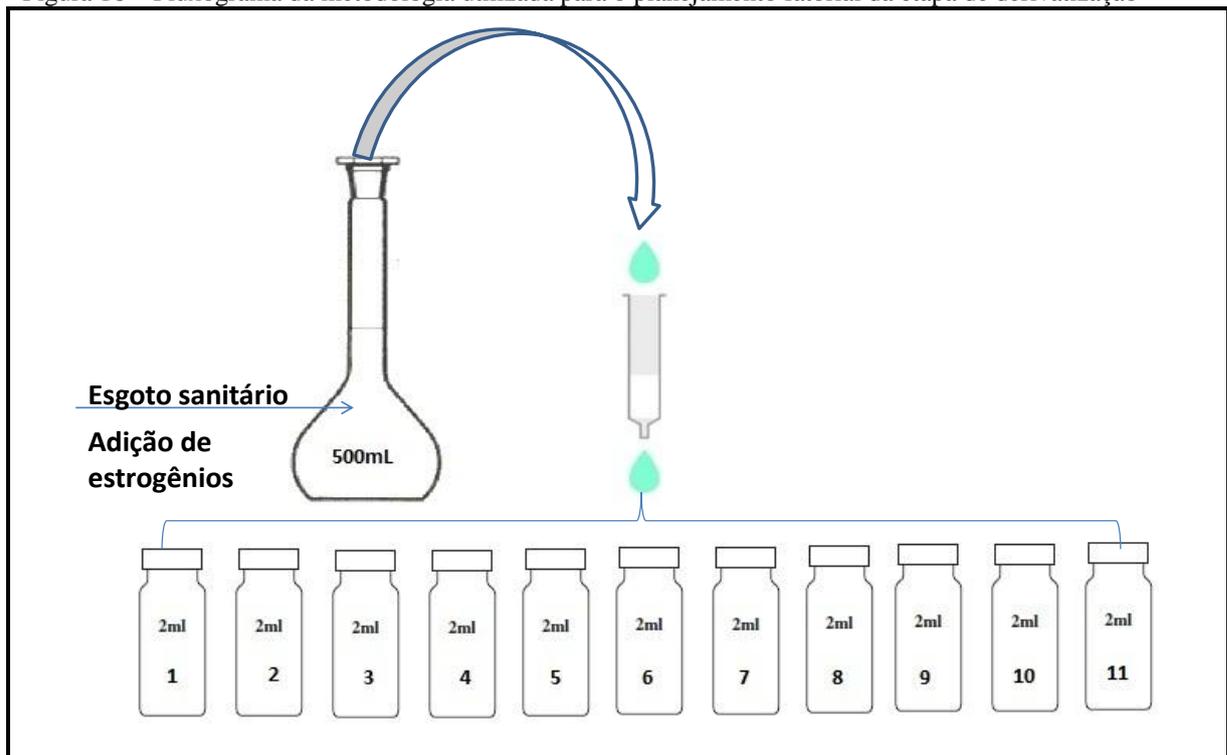
Continuação da Tabela 8 – Planejamento fatorial de otimização da etapa de derivatização

9	50	60	30
10	75	80	45
11	25	80	45

Fonte: AUTORA, 2012

Os estrogênios analisados foram adicionados à matriz de esgoto sanitário na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, os analitos foram concentrados por extração em fase sólida (SPE) e eluídos com 11 mL de MeOH; o extrato foi homogeneizado sendo retiradas alíquotas de 1 mL distribuídas em *vials* de 2 mL para secura e adicionados o reagente BSTFA. O fluxograma com a metodologia empregada está apresentado na Figura 16. As respostas foram analisadas em termos de área dos picos dos analitos.

Figura 16 – Fluxograma da metodologia utilizada para o planejamento fatorial da etapa de derivatização



Fonte: AUTORA, 2012

4.4 Otimização da Etapa de Concentração dos Analitos - Extração em Fase Sólida (SPE)

O desenvolvimento da metodologia analítica para concentração de estrogênios presentes em esgotos sanitários por meio da extração em fase sólida (SPE) foi realizada em etapas, sendo estudado: tipo de eluente, efeito da acidificação da matriz ambiental, volume de quebra, material adsorvente empregado, adição de isopropanol e, posteriormente, foi realizado um planejamento fatorial para a SPE como forma de otimização da metodologia.

4.4.1 Estudo do eluente

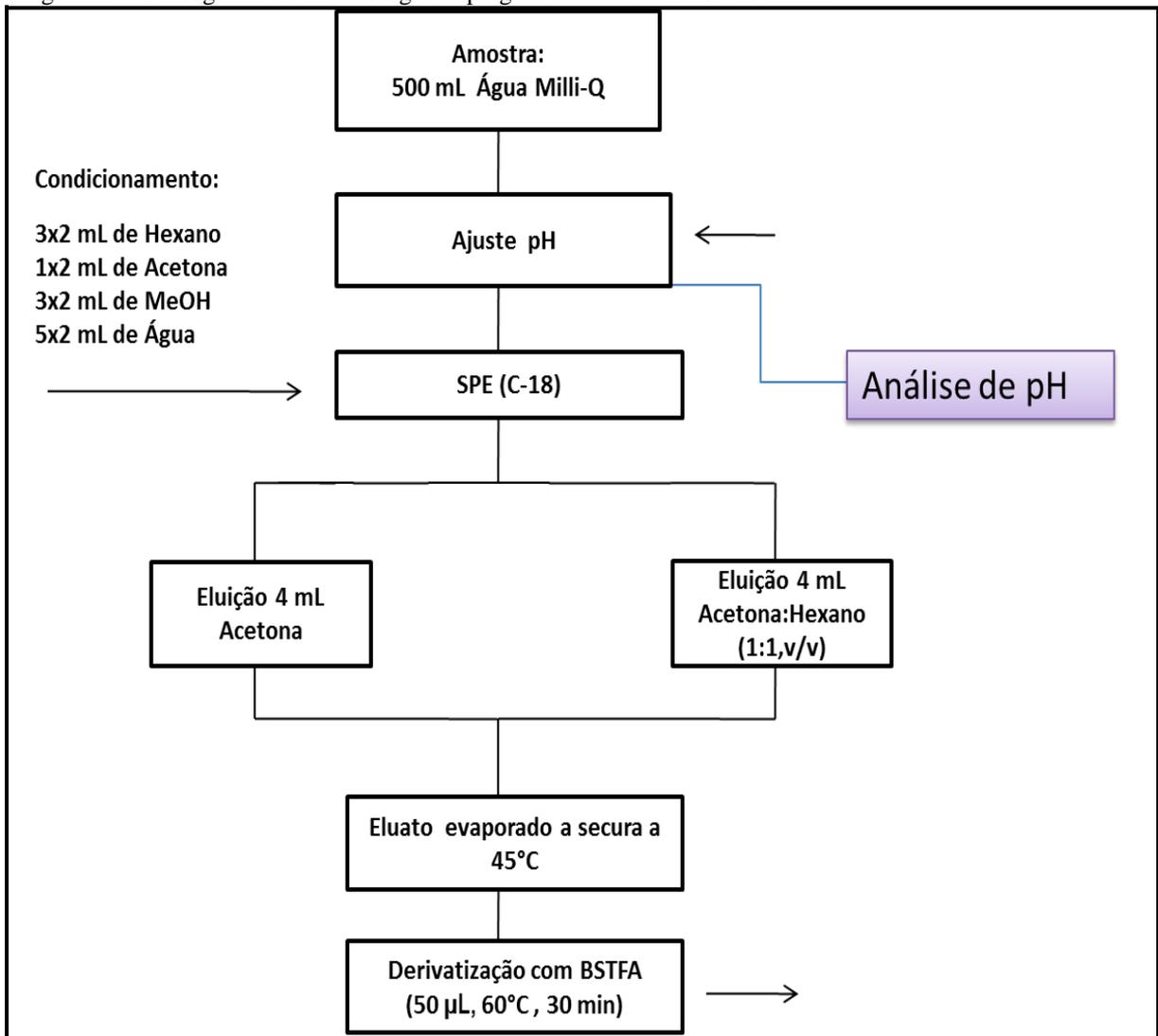
Com o objetivo de otimizar a escolha do solvente a ser empregado na etapa de eluição dos analitos foram selecionados os solventes: acetona, uma mistura de acetona:hexano (50:50,v/v) (TAN *et al.*, 2007), sendo utilizado um volume de 4 mL para cada eluição, e uma concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. A matriz utilizada para o estudo foi Água Milli-Q.

O cartucho utilizado durante essa etapa foi o DSC-18, sendo o condicionamento do cartucho realizado com 6 mL de hexano, 6 mL de acetona, 6 mL de MeOH e 10 mL de água Milli-Q.

Após a concentração dos analitos (SPE), o cartucho permaneceu sob sistema de vácuo por 30 minutos para que pequenas quantidades de água fossem eliminadas. Os eluatos foram levados à secura total em estufa a 45°C (LIU *et al.*, 2004b) objetivando a remoção de toda água de forma a não prejudicar a etapa de derivatização, como foi observado em estudos anteriores realizados no laboratório de Saneamento (LABOSAN), os quais serão discutidos posteriormente.

Na Figura 17 está apresentado o fluxograma do estudo de eluentes.

Figura 17 – Fluxograma da metodologia empregada durante a análise de efluente



Fonte: AUTORA, 2012

4.4.2 Estudo da acidificação da amostra ambiental

Devido às divergências sobre a real necessidade desse procedimento, a metodologia aplicada nas amostras ambientais coletadas foi avaliada sem a modificação do pH (faixa 6 - 7) e em pH 3, adicionando ácido clorídrico (HCl) concentrado. Essa avaliação foi realizada utilizando a mesma metodologia para o estudo de efluentes, apresentada na Figura 17, sendo selecionado o eluente que obteve melhor resultado.

4.4.3 Avaliação dos materiais adsorventes

Foram avaliados os três tipos de materiais adsorventes citados anteriormente na Tabela 5 (vide item 4.1.2). Foi adicionado uma solução multielementar dos estrogênios na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ à matriz aquosa (água Milli-Q – Millipore). Os cartuchos foram condicionados com 10 mL de uma mistura MeOH:Acetona (50:50, v/v) e eluídos com 4 mL da mesma mistura. Os extratos foram levados à secura, derivatizados e, posteriormente, analisados por CG/MS. O estudo foi realizado em duplicata e com análise do branco. A avaliação dos cartuchos foi realizada em termos de recuperação (%) dos estrogênios. Segundo Mayer *et al.* (1995) as características físicas dos materiais adsorventes, como área de superfície, tamanho da partícula, tamanho do poro ou volume de poro são propriedades cruciais para a escolha do material, as quais são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Propriedades físicas de caracterização das partículas dos cartuchos DSC-18, Oasis HLB e Strata-X

Parâmetro	Unidade	DSC-18 ¹	Oasis® HLB ²	Strata™-X ³
Área de superfície	(m ² /g)	463	823	818
Diâmetro do poro	(Å)	73	82	88
Volume do poro	(mL/g)	0,85	1,34	1,26
Diâmetro da partícula	(µm)	53	30,3	28

Fonte: ¹ Certificado de análise emitido pela Supelco (2008); ² Certificado de análise emitido pela Waters (2011); ³ Certificado de análise emitido pela Phenomenex (2010)

4.4.4 Planejamento Fatorial para a SPE

O planejamento fatorial (*experimental design*) vem sendo utilizado com o objetivo de minimizar erros analíticos causados quando a interação entre os fatores é negligenciada, como por exemplo, um ótimo valor de pH para uma reação enzimática pode depender da temperatura utilizada, e vice-versa. Os fatores que possam interferir nos resultados do experimento devem ser previamente identificados e analisados estatisticamente para

determinação da condição ótima de trabalho, onde vários fatores estão envolvidos (MILLER e MILLER, 2005).

A etapa de SPE foi otimizada pelo planejamento fatorial com análise de quatro fatores (2^4). Foram identificados como interferentes no processo de SPE os seguintes fatores: tipo de eluente, tipo de cartucho, pH e volume de amostra. O planejamento foi realizado em dois níveis (+1 e -1), sem ponto central, randomizado. Como fator resposta foi utilizado a área do pico do analito analisado. O *software* utilizado durante o estudo foi o *Statgraphics® Centurion XV*. A concentração avaliada foi a de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, com o objetivo de se obter uma boa visualização nos resultados. Na Tabela 10 estão apresentados os níveis atribuídos aos fatores analisados.

Tabela 10 – Valores atribuídos aos fatores analisados durante o planejamento fatorial para SPE

Fatores	-1	+1	Unid.	Contínuo
Eluente	A	B	--	Não
Cartucho	Oasis	Strata-X	--	Não
pH	3	7	--	Sim
Volume de amostra	250	500	mL	Sim

Os ensaios realizados durante o planejamento do experimento podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11 – Planejamento fatorial (2^4) para SPE

Ensaio	Eluente	Cartucho	pH	Volume, mL
1	B	Strata-X	7	250
2	B	Strata-X	7	500
3	B	Oasis HLB	7	250
4	A	Strata-X	7	250
5	B	Oasis HLB	7	500
6	A	Strata-X	3	500
7	A	Strata-X	7	500

Continuação da Tabela 11 – Planejamento fatorial (2^4) para SPE

8	B	Oasis HLB	3	500
9	A	Oasis HLB	3	500
10	B	Oasis HLB	3	250
11	A	Oasis HLB	7	250
12	A	Oasis HLB	7	500
13	A	Oasis HLB	3	250
14	A	Strata-X	3	250
15	B	Strata-X	3	500
16	B	Strata-X	3	250

Fonte: AUTORA, 2012

Legenda: A) MeOH; B) MeOH: Acetona (60:40, v/v)

4.4.5 Estudo da adição do modificador orgânico isopropanol

O composto isopropanol ($H_3C - HCOH-CH_3$) foi adicionado à matriz na proporção de 10:1 (efluente: isopropanol), sendo utilizados 500 mL de amostra, ou seja, a concentração utilizada foi de $78,6 \text{ g L}^{-1}$. Como matriz ambiental foi utilizado efluente sanitário, sendo adicionados à matriz os padrões dos estrogênios na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. A metodologia foi a mesma aplicada no estudo de recuperação, o qual foi realizado em paralelo ao estudo de isopropanol. O cartucho utilizado foi o Oasis HLB®.

4.5 Validação do Método Analítico

Os parâmetros analíticos validados foram: precisão; linearidade; limite de detecção; limite de quantificação e ensaio de recuperação.

Devido à inexistência de sistemas de validação que assegurem a confiabilidade dos procedimentos analíticos adotados para a determinação dos desreguladores endócrinos a validação do método analítico do presente trabalho foi realizada seguindo os critérios de documentos usualmente utilizados (INMETRO, 2006; ABNT-NBR 14029, 2005c; LANÇAS, 2004; BRASIL, 2003) e literatura científica (RIBANI *et al.*, 2004; HUBER, 2007).

A precisão é normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as formas mais comuns de expressá-las são por meio da repetibilidade e a reprodutibilidade, sendo expressas através do desvio-padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV), obtido a partir de injeções repetidas, em que são sugeridas cinco ou mais repetições (LANÇAS, 2004).

A precisão instrumental foi determinada com base nas áreas e tempo de retenção dos compostos da solução padrão multielementar na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (50ppb) em dez replicatas, sendo calculado coeficiente de variação (CV%), de acordo com a Equação 3.

$$CV(\%) = \frac{\text{DesvioPadrão}}{\text{ConcentraçãoMédia}} \times 100 \quad (3)$$

Segundo manual da AOAC - *Association of Official Analytical Chemists* (1998) a precisão deve ser estimada de acordo com a concentração do analito observada, conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Concentração do analito vs Precisão

Concentração do analito	CV%
100 ppm	5,3
10 ppm	7,3
1 ppm	11
100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30

Fonte: Adaptado de AOAC (1998) *apud* HUBER (2007)

Legenda: ppm: mg L^{-1} ; ppb: $\mu\text{g L}^{-1}$

A faixa linear da curva de calibração é definida como a faixa de concentração na qual a sensibilidade (*slope*) pode ser considerada constante. No presente trabalho a faixa linear foi obtida por padronização externa, sendo calculado o coeficiente de correlação linear (R) devendo este apresentar um valor igual ou superior a 0,99, recomendando pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). As faixas de trabalho variaram de 0,010 a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O limite de quantificação é definido como sendo a menor quantidade detectável com precisão e exatidão, já o limite de detecção representa a menor quantidade do composto de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (LANÇAS, 2004).

Os limites de detecção e quantificação podem ser determinados por três maneiras diferentes: método visual, método de relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros na curva analítica.

Selecionou-se inicialmente o método visual, realizando-se injeções de soluções padrões com diferentes concentrações. Após chegar a um valor aproximado do limite de detecção, foi aplicado o procedimento analítico para calcular o LD e LQ, a partir do método baseado em parâmetros da curva analítica, uma vez que esse método é considerado de maior confiabilidade, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão linear (RIBANI *et al.*, 2004).

As equações utilizadas para o cálculo do LD e LQ são apresentados nas Equações 4 e 5.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (5)$$

Onde, *DPa* é a estimativa do desvio padrão da resposta de, no mínimo, sete injeções da menor concentração da curva analítica; e *IC* é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003).

O estudo de recuperação foi realizado para os dois cartuchos utilizados durante a pesquisa, a saber: DSC-18 e Oasis HLB. Para o cartucho DSC-18, a concentração analisada dos hormônios foi de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e para Oasis HLB foi de 500 ng L^{-1} , sendo adicionada na amostra (esgoto sanitário) uma solução multielementar antes da etapa de extração dos analitos por SPE. A recuperação foi calculada segundo a Equação 6.

Foi realizado um branco utilizando-se a mesma metodologia SPE com água Milli-Q para a verificação de possíveis contaminações durante o procedimento analítico (efeito matriz).

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

C_1 = concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada (branco);

C_3 = concentração adicionada.

4.6 Monitoramento dos desreguladores endócrinos (DEs) e do micropoluente colesterol em esgotos sanitários de ETEs e em águas superficiais

4.6.1 Monitoramento dos desreguladores endócrinos e do micropoluente colesterol em esgotos sanitários

As coletas das amostras foram realizadas nas estações de tratamento de esgotos sanitários (ETEs) listadas na Tabela 13 e apresentadas nas Figuras 18 a 22, sendo estas classificadas por tipo de tratamento. Para a avaliação da ocorrência dos DEs e micropoluente colesterol foi realizada uma campanha de 25 coletas dos afluentes e efluentes das unidades de tratamento. No Anexo A estão apresentados os dados dos projetos das ETEs selecionadas, os quais não puderam ser confirmados *in loco*. As amostras foram coletadas de forma simples no período da manhã entre 8:00 e 10:00 h. No caso das lagoas de estabilização a profundidade da coleta foi de aproximadamente 1 metro.

Tabela 13 – Estações de tratamento de esgoto selecionadas para avaliação de eficiência de remoção de DES classificadas por tipo de tecnologia empregada

Localização ETE - Abreviatura	Tipo de tratamento	Período da coleta
Conjunto José Walter (CJW)	LF + Lagoa Maturação (LM)	Abril 2010 – Abril 2012
Tabapuá (TB)	LF + Lagoa Maturação (LM)	Mai 2010 – Dezembro 2011
Conjunto Nova Metrópole (CNM)	Lagoa facultativa - LF	Mai 2010 – Janeiro 2012
Residencial Itaperussu (LA)	Lodos Ativados (LA)	Junho 2010 – Março 2012
Conjunto Itaperi II (UASB)	Reator de manto de lodo e fluxo ascendente (UASB) seguido de cloração	Novembro 2011 – Abril 2012

Fonte: AUTORA, 2012

Figura 18 – Local de amostragem do Conjunto José Walter, Fortaleza- CE



Fonte: AUTORA, 2011; Adaptado de *GOOGLE EARTH*, 2011

Legenda: A) Esgoto Bruto; B) Esgoto tratado; C) Vista satélite da ETE

Figura 19 – Local de amostragem na ETE de Tabapuá, localizada em Caucaia, CE



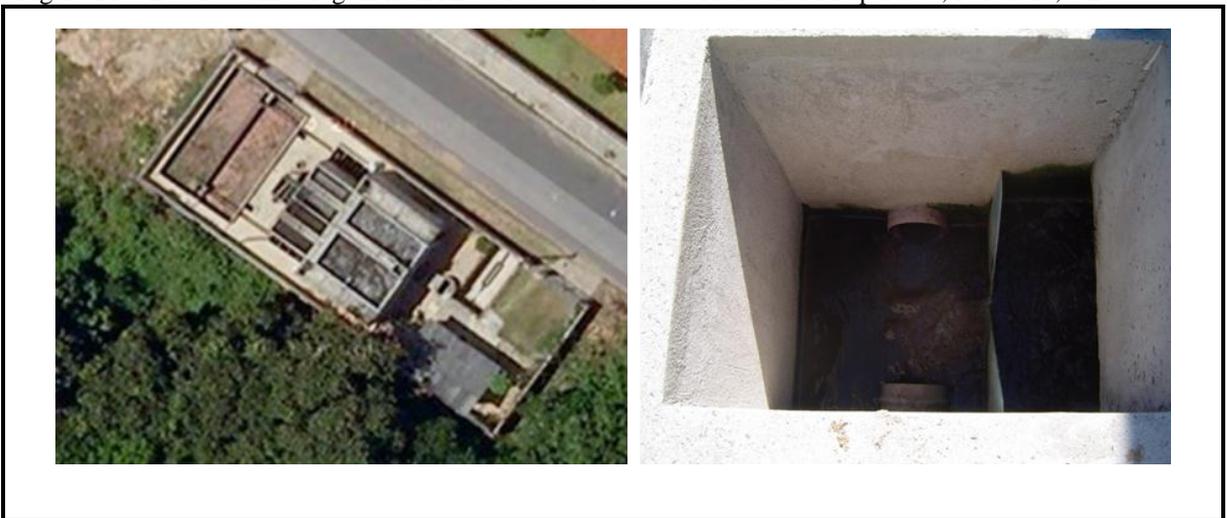
Fonte: Adaptado de *GOOGLE EARTH*, 2011

Figura 20 – Local de amostragem na ETE do Conjunto Nova Metr pole, localizado em Caucaia, CE



Fonte: Adaptado de *GOOGLE EARTH*, 2011

Figura 21 – Local de amostragem na ETE de lodos ativados do Residencial Itaperussu, Fortaleza, CE



Fonte: *GOOGLE EARTH*, 2011; AUTORA, 2011

Figura 22 – Local de amostragem na ETE do Conjunto Itapery II, utilizando como sistema de tratamento reator UASB, Fortaleza, CE



Fonte: *GOOGLE EARTH*, 2012

As coletas das amostras foram feitas de forma pontual antes e depois do tratamento, sendo a eficiência da tecnologia calculada segundo a Equação 7:

$$\text{Eficiência de remoção(\%)} = \frac{(\text{Concentração Afluente} - \text{Concentração Efluente})}{\text{Concentração Afluente}} \times 100 \quad (7)$$

Durante a coleta das amostras foi utilizado recipiente de alumínio com volume de 10 litros, sendo transferidos para frascos de vidro âmbar para análises cromatográficas, físico-químicas e de ecotoxicidade.

Para as análises cromatográficas foram adicionados antes da coleta 10 mL de formaldeído por litro de amostra para impedir a biodegradação dos analitos de interesse (CAVALCANTE *et al.*, 2010) e 0,1 mL de solução a 3% de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) às amostras coletadas nas ETES LA e UASB. Este último reagente foi utilizado como agente neutralizador de cloro livre, além de prevenir a degradação dos estrógenos. A remoção de cloro torna-se necessária para evitar que o mesmo cause danos à coluna cromatográfica, uma vez que é um agente fortemente oxidante (VERBINNEN; NUNES, 2010). As amostras foram transportadas em caixa térmica com gelo até o laboratório de análise (LABOSAN). Quando havia impossibilidade de a análise ecotoxicológica ser realizada em 48 horas, as amostras eram congeladas para análise em no máximo 2 semanas, conforme recomendação da norma alemã DIN 38412-1 (KNIE, 2004).

4.6.2 Tratamento dos dados de concentração dos micropoluentes

Os dados obtidos durante a pesquisa são representados em diagramas de *box plot*, ou também conhecido como diagrama de caixa e bigode. O diagrama é utilizado para mostrar a mediana, espalhamento e intervalo interquartílico dos dados. Na Figura 23 é mostrado um exemplo de diagrama *box plot* e seus componentes. A distância entre a linha mais inferior e a aresta inferior da caixa é a amplitude onde os 25 % dos dados mais baixos podem ser encontrados (denominado quartil inferior). A caixa mostra os 50 % dos dados situados no meio do conjunto de valores (intervalo interquartílico): isto é, 50 % dos dados obtidos são maiores do que a parte mais baixa da figura, mas menores do que a parte superior da figura. A distância entre a aresta superior da caixa e a linha horizontal superior mostra o intervalo onde os 25 % maiores dados poderão ser encontrado (quartil superior). No meio da caixa há uma linha horizontal, essa linha representa a mediana (FIELD, 2009).

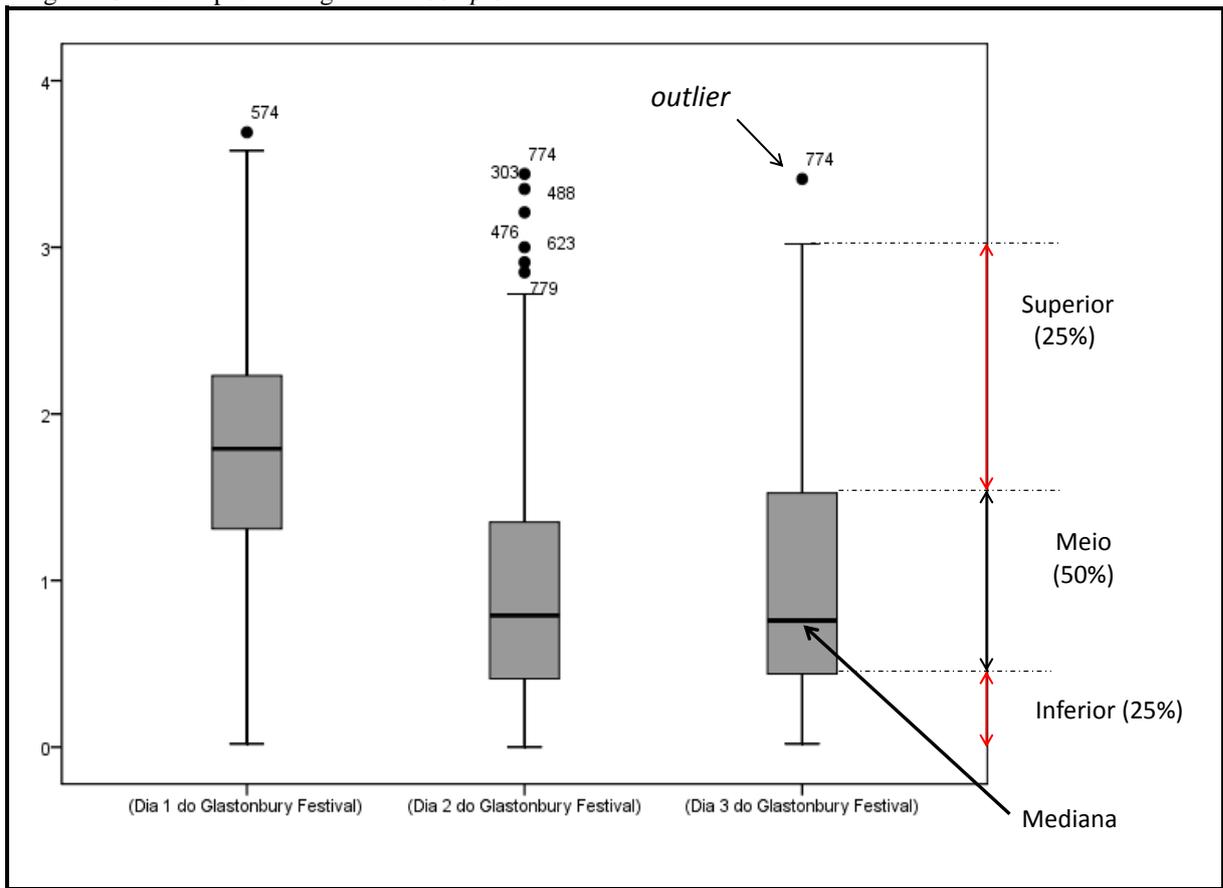
O diagrama de *box plot* também pode nos informar se a distribuição dos dados é simétrica ou assimétrica, baseada na diferença entre as distâncias entre o quartil inferior e o quartil superior, sem ambos apresentarem o mesmo valor de distância da caixa os dados são considerados simétricos, se não, são assimétricos (FIELD, 2009)

A avaliação de dados discrepantes¹ é fundamental em qualquer análise exploratória de dados, pois tais valores podem fornecer informações importantes ou afetar fortemente algumas estatísticas, como a média e o desvio padrão, como também podem distorcer a distribuição dos dados amostrais, comprometendo, assim, testes estatísticos que dependam destas características (TRIOLA, 2008). Nesse contexto, a avaliação dos valores atípicos se baseou na diferença dos valores em relação ao intervalo interquartílico para cada conjunto de dados.

Assim, valores que superam o terceiro quartil em 150 % do valor do intervalo interquartílico² (IIQ) do conjunto de dados ou que são inferiores ao primeiro quartil em 150 % do IIQ foram considerados valores atípicos ou *outliers*. Nos diagramas de *box plot* aqui apresentados, os dados atípicos são representados por círculos preenchidos (CARNEIRO, 2012).

¹ Valores discrepantes ou *outliers* são valores considerados incomuns por estarem relativamente afastados da maioria dos demais dados.

² Intervalo interquartílico é a diferença entre o terceiro e o primeiro quartil do rol de dados, representado assim, a amplitude dos 50% de valores centrais do conjunto de dados considerado.

Figura 23 – Exemplo de diagrama de *box plot*

Fonte: Adaptado de FIELD (2009)

4.6.3 Identificação dos desreguladores endócrinos em águas superficiais

Para a detecção de DEs em águas superficiais foram selecionados dois pontos dos rios Ceará e Cocó, representados nas Figuras 24 e 25. As coletas foram realizadas durante o mês de dezembro no ano de 2010. As coordenadas UTM (*Universal Transversa de Mercator*) dos pontos de coletas são apresentados na Tabela 14. Já na Tabela 15 estão apresentados os valores dos fatores de concentração e o volume de amostra utilizado para as amostras analisadas. As metodologias aplicadas para as análises físico-químicas e microbiológicas são apresentadas no Anexo B.

Tabela 14 – Coordenadas UTM para os pontos de amostragem dos rios Ceará e Cocó

Amostra	UTM
P1CE	05410/9586467
P2CE	0545721/9591191
P1CC	0562412/9583095
P2CC	0540377/9560264

Fonte: AUTORA, 2012

Tabela 15 – Fator de concentração e volume de amostra utilizado para as amostras coletadas

Amostra	Fator de concentração	Volume de amostra
Esgoto Sanitário	1000 vezes	500 mL
Água Superficial	20000 vezes	1000 mL

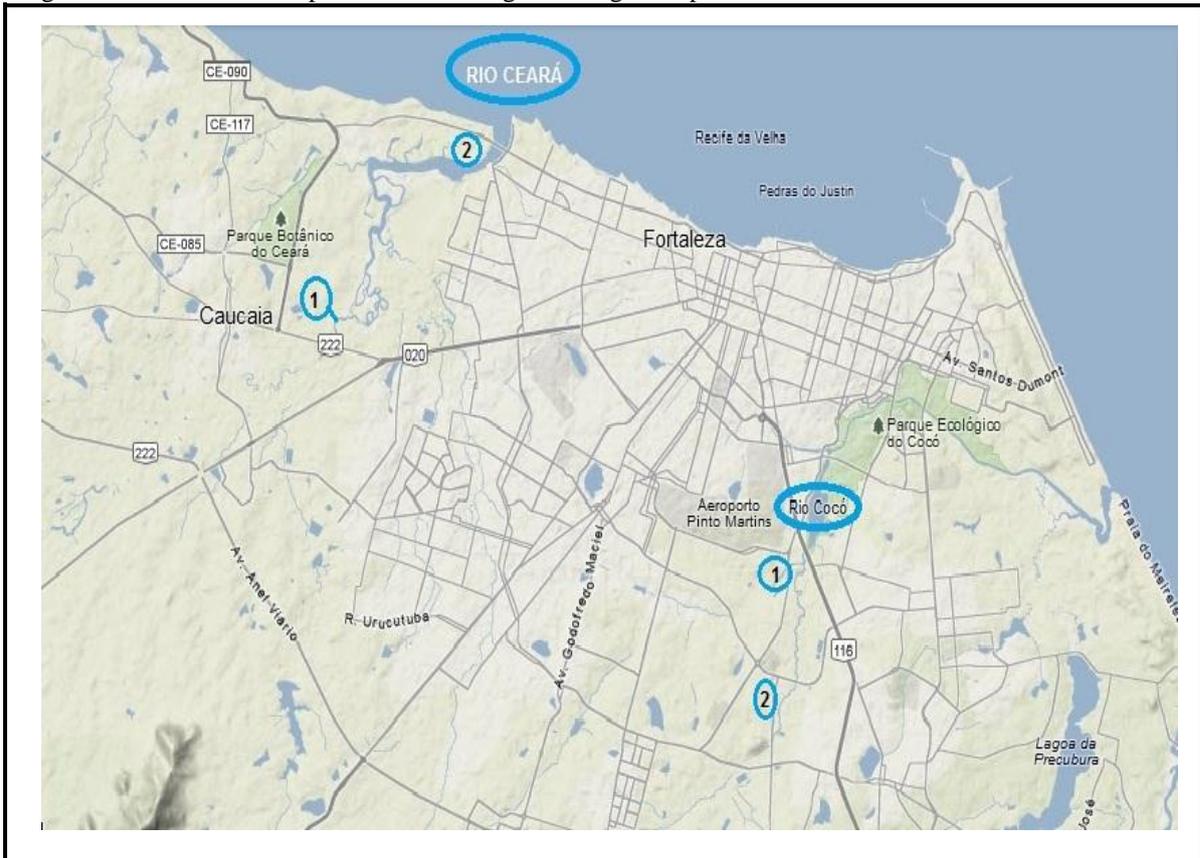
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 24 – Pontos de amostragem de águas superficiais dos rios Ceará e Cocó



Fonte: AUTORA, 2010

Figura 25 – Vista área dos pontos de amostragem das águas superficiais



Fonte: Adaptado de *Google Maps*, 2012

4.7 Ensaio Ecotoxicológicos

4.7.1 Cultivo do organismo teste - *Daphnia magna*

O organismo-teste deste estudo, *Daphnia magna* (Figura 26), foi fornecido pelo Laboratório de Análises Integradas de Mananciais e Águas Residuárias (LIAMAR) do Instituto Federal de Educação Tecnológica do Ceará (IF-CE).

Figura 26 – Organismo *Daphnia magna* com 24 horas (lente 40x)



Fonte: AUTORA, 2012

A metodologia para cultivo e para realização dos ensaios segue a NBR 12713 / 2009 (Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda Método de ensaio com *Daphnia* spp).

As vidrarias novas foram lavadas com solução de ácido clorídrico 10%, água da torneira e água destilada, sendo utilizadas exclusivamente na ecotoxicologia e separadas de acordo com uso conforme mostrado na Figura 27.

Figura 27 – Vidrarias utilizadas no laboratório de ecotoxicologia do LABOSAN.



Fonte: AUTORA, 2012

Legenda: A) Azul - cultivo de *D.magna* B) Verde - cultivo das algas. C) Vermelha - ensaios de toxicidade.

No cultivo de *D. magna* utilizou-se água reconstituída, com dureza total ajustada entre 175 a 225 mg CaCO₃/L e pH variando entre 7,0 e 8,0. A água de cultivo depois de preparada foi aerada, antes de sua utilização, durante 24 horas para a completa solubilização dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH. Os valores de pH, dureza e oxigênio dissolvido foram medidos e anotados para garantia da sobrevivência e reprodução dos organismos.

Foram mantidos em béqueres ou aquários no máximo 25 organismos por 1 L de água de cultivo. Os cultivos foram conduzidos em câmaras de germinação (Tecnal - 401) com temperatura ajustada para 20°C ± 2°C e iluminação difusa com foto-período de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. A água de cultivo foi mantida na câmara de germinação antes da sua utilização para evitar diferenças de temperatura maior que 2° C.

A água de cultivo juntamente com béqueres e aquários foram trocados duas vezes por semana para a remoção das carapaças, excretas e neonatos excedentes. Os organismos foram manuseados com pipetas de *Pasteur* com diâmetro compatível ao tamanho dos mesmos. A cada semana iniciou-se o cultivo de novos lotes de organismos para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste. Os organismos com idade superior a quarenta dias eram sacrificados antes de serem descartados, visto que não é uma espécie autóctone.

Para a alimentação das daphnias utilizou-se a alga verde unicelular *Pseudokirchneriella subcaptata*, durante fase exponencial de crescimento. Adotou-se para a alimentação dos cultivos uma concentração de 4,5x10⁶ células/Daphnia, o tipo e a quantidade de alga foram analisados por Monteiro (2009) a qual chegou ao melhor resultado em termos de reprodução, sendo adotado durante a presente pesquisa. O alimento foi fornecido diariamente, ou com intervalo máximo de dois dias (nos finais de semana). Para o

fornecimento de uma quantidade fixa de algas por organismo foi elaborada uma curva de crescimento das algas.

4.7.2 Cultivo da alga *Pseudokirchneriella subcaptata*

A cepa da alga *Pseudokirchneriella subcaptata* (anteriormente denominada de *Selenastrum capricornutum*) foi fornecida pelo laboratório integrado de águas mananciais e águas residuárias (LIAMAR) do Instituto Federal de Educação Tecnológica do Ceará (IF-CE). Para cultivo da alga *P. subcaptata* (Figura 28) utilizou-se o meio de cultura LC OLIGO conforme a norma de toxicidade que descreve o cultivo e o método de ensaio para estas algas (ABNT, 2005a).

As soluções para a preparação do meio LC OLIGO foram preparadas e posteriormente estocadas entre 4°C a 10°C, por no máximo seis meses. Quando os valores de pH dos meios não estavam adequados (entre 6,0 e 8,0) fazia-se o ajuste com soluções de ácido clorídrico (HCl) ou de hidróxido de sódio (NaOH). Estes meios foram agitados durante 1 hora e autoclavados por 15 minutos a 121°C.

As culturas-estoque de algas que serviam como inóculo foram mantidas até no máximo por três meses entre 4°C a 10°C em meio sólido de forma a se obter células viáveis para a sementeira. A inoculação em meio líquido foi realizada em ambiente asséptico e as culturas de algas foram mantidas entre 20°C a 30°C, sob iluminação constante até o sétimo dia de crescimento.

Após atingir o crescimento exponencial, as algas foram centrifugadas, o líquido sobrenadante (meio de cultura da alga) descartado e utilizou-se na alimentação a biomassa diluída em água de cultivo para *Daphnia magna*, evitando-se a interferência de nutrientes e compostos que poderiam ser tóxicos aos organismos-teste. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro da suspensão de biomassa em água de cultivo e com o auxílio da curva de crescimento da alga pode-se calcular a quantidade de algas por unidade de volume. Assim, fornecia-se uma quantidade fixa para a alimentação do cultivo dos organismos. O preparo do alimento foi realizado semanalmente e mantido sob refrigeração para posterior utilização.

Figura 28 – Cultivo da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Fonte: AUTORA, 2012.

4.7.3 Curva de crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Para elaboração da curva de crescimento da alga, inoculou-se 2 mL de meio de cultivo com algas em fase exponencial ou *log* (fase em que as células começam a dividir-se regularmente a uma taxa constante) em *erlenmeyer* com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo. O experimento foi realizado em triplicata. O acompanhamento do crescimento das algas foi feito mediante uso de câmara de *Neubauer* por contagem direta sob observação em microscópio ótico (Opton 108 - trinocular).

Foram colocados aproximadamente 3 mL de amostra do *erlenmeyer*, em um tubo de ensaio. Com o auxílio de uma pipeta automática colocou-se uma alíquota de 15 μ L entre a lamínula e a câmara de *Neubauer*, distribuindo-se pela superfície de contagem por capilaridade. Após a sedimentação das algas (aproximadamente três minutos) realizou-se a contagem das algas e leitura da absorbância no espectrofotômetro (Thermo – Nicolet Evolution 100). Utilizou-se o comprimento de onda de 750 nm, conforme recomendado na NBR 12648 / 2005.

A câmara de *Neubauer* tem profundidade de $0,1 \text{ mm}^2$ e volume de $0,9 \text{ mm}^3$, sendo formada por nove quadrados “grandes”, cada um deles com $1,0 \text{ mm}^2$. Os quatro quadrados que formam os vértices da câmara são divididos em 16 quadrados menores; o quadrado central de $1,0 \text{ mm}^2$ é subdividido em 25 quadrados menores, cada qual com área de $0,0025 \text{ mm}^2$ (LOURENÇO, 2006).

Conforme afirma Lourenço (2006) a contagem pode ser realizada de forma parcial contando 5 quadrados (os 4 vértices e o quadrado central) ou cinco quadrados em diagonal. A densidade de células por unidade de volume (mL) é obtida multiplicando-se o número contado pelo fator 50.000. Adotou-se neste estudo a primeira forma de contagem.

A partir dos dados obtidos por contagem direta em câmara de *Neubauer* em microscópio óptico e posterior cálculo da quantidade de células em 1 mL de meio de cultura e leitura da absorbância em espectrofotômetro pode-se plotar curvas de crescimento, fundamentais para facilitar o fornecimento de quantidades fixas de alimento por *daphnia* necessário para avaliar a quantidade e o tipo de alimento sobre a reprodução de *Daphnia magna* quando cultivada em laboratório (MONTEIRO, 2009).

4.7.4 Ensaio de Sensibilidade

A sensibilidade dos organismos foi testada, pelo menos uma vez por mês, conforme metodologia descrita na NBR 12713 (ABNT, 2009). Utilizou-se como substância de referência o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nas concentrações de 0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,8; $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, para o cálculo em 48 horas, as concentrações 0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,2 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, para o cálculo em 24 horas.

As diluições foram preparadas a partir da adição de volumes conhecidos de uma solução-estoque de dicromato de potássio de 10 mg L^{-1} . Os ensaios foram realizados nas mesmas condições do ensaio definitivo, em triplicada, com um total de no mínimo 21 organismos por concentração testada, sem alimentação.

Os ensaios de sensibilidade foram realizados para avaliar a sensibilidade dos organismos quando expostos à substância de referência, como também a repetibilidade do método analítico ao longo do tempo, permitindo comparações interlaboratoriais. Além disso, os testes eram realizados visando assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados conforme ISO 6341 (ISO, 1996),

que determina a faixa da CE_{50-24h} entre 0,6 a 1,7 mg L⁻¹, para a substância de referência já citada.

A norma brasileira recomenda que somente se realize ensaios de toxicidade quando a carta-controle possuir pelo menos cinco resultados e que sejam realizados ensaios até se obter 20 resultados.

A qualidade da água de cultivo e de diluição também foi avaliada indiretamente pelos resultados obtidos na carta-controle de sensibilidade.

Para a elaboração da carta-controle de sensibilidade, foram calculados dois desvios-padrão (2σ), superior e inferior à média obtida. Estes valores foram grafados na carta-controle através de linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade.

4.7.5 Ensaio de Toxicidade Aguda

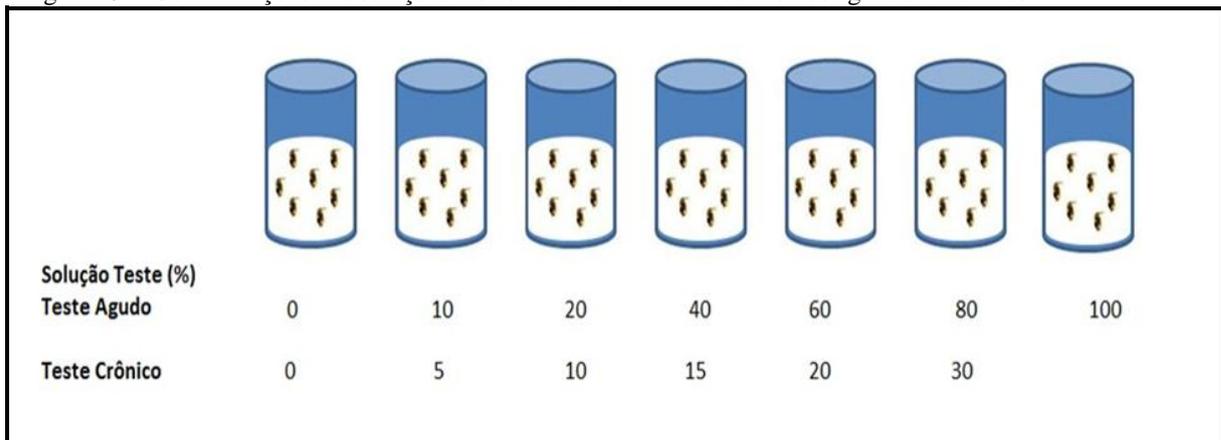
A metodologia adotada para o ensaio de toxicidade segue as recomendações da NBR 12713 (ABNT, 2009).

As amostras foram mantidas em frascos de vidro âmbar e os ensaios foram realizados em menos de 48 horas, na impossibilidade de sua realização em menos de 48 horas as amostras foram congeladas para serem analisadas em no máximo 2 semanas, segundo a norma DIN 38412-1 (KNIE, 2004).

As soluções testes foram preparadas no momento da realização do ensaio e para preparo destas soluções nas diluições necessárias utilizou-se água de diluição. A dureza deveria estar entre 175 a 225 mg CaCO₃/L, o oxigênio dissolvido maior que 1,0 mg O₂ L⁻¹ e a temperatura em 20°C ± 2°C antes da transferência dos neonatos.

O ensaio definitivo consistiu na exposição dos neonatos a diferentes diluições da amostra, conforme apresentado na Figura 29. Os organismos jovens utilizados nos ensaios continham de 2 h a 26 h e foram obtidos por partenogênese, a partir da terceira postura das *Daphnias* (mãe). Os ensaios foram realizados em triplicata. Em cada diluição e para o controle foram adicionados no mínimo 21 organismos. Utilizou-se 25 mL de solução-teste em recipientes com capacidade de 40 mL (Figura 30) que foram mantidos em câmara de germinação escura. Foram contados os neonatos mortos nos testes em 24 horas e em 48 horas. Os dados referentes à quantidade de neonatos mortos para cada diluição e controle foram inseridos no programa estatístico '*Trimmed Spearman Karber*' para o cálculo de CE_{50} (concentração efetiva que provoca imobilidade e / ou mortalidade de 50% dos organismos).

Figura 29 – Concentrações das soluções testes utilizadas durante os ensaios agudos e crônicos



Fonte: Adaptado de MONTEIRO, 2009

Figura 30 – Aparatos utilizados durante a realização dos ensaios de ecotoxicidade



Fonte: AUTORA, 2012

Considerando que o valor da CE_{50} é inversamente proporcional à toxicidade da amostra (quanto menor o valor da CE_{50} , maior a toxicidade da mesma), a transformação desses valores em unidade tóxica (U.T.) pode facilitar a compreensão dos resultados, visto que a mesma apresenta uma relação direta com o grau de toxicidade da amostra (quanto maior o valor da U.T., maior a toxicidade). Para os bioensaios realizados, a unidade tóxica (U.T.) foi calculada a partir da Equação 8 (IBAMA, 1987).

$$U.T. = \frac{100}{CE_{50}} \quad (8)$$

As amostras foram classificadas segundo o IBAMA (1987), o qual classifica o nível de toxicidade das amostras em função dos valores obtidos de CE_{50} , conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16 – Classificação de toxicidade das amostras em função do valor de CE_{50} .

CE_{50} (% da amostra original)	U.T.	Classificação da amostra
25	4	Muito tóxica
25 – 50	4 - 2	Tóxica
51-75	1,96 – 1,33	Moderadamente tóxica
75	1,33	Levemente tóxica

Fonte: IBAMA, 1987

Para o cálculo da eficiência de remoção da toxicidade aguda foi utilizada a equação 7, anteriormente apresentada no item 4.6. Para a realização dos gráficos *box plot* foi utilizado o *software SSPS Statistics 17.0*.

4.7.6 Ensaio de Toxicidade Crônica

Devido à inexistência de uma norma brasileira para testes de toxicidade crônica a metodologia foi desenvolvida baseada em trabalhos publicados como da autora Brentano, (2006), além da norma ABNT-NBR 13.373, que desenvolveu o método de ensaio para teste crônico em *Ceriodaphnia spp.* (ABNT, 2005b). A nível internacional foi utilizado o trabalho publicado por Mendonça *et al.* (2009), os quais seguiram a norma da ISO 10706:2000 para a elaboração do ensaio crônico.

Para realização dos ensaios, foram utilizados organismos jovens, com 2 a 26 horas de idade, obtidos a partir da terceira postura de fêmeas cultivadas. O método consistiu na exposição dos organismos jovens da espécie *Daphnia magna*, a várias diluições da amostra por um período de 21 dias.

Cada ensaio foi realizado com 5 diluições da amostra, além do controle (água de diluição). A faixa da diluição utilizada para amostra era selecionada de acordo com o resultado obtido para o teste agudo da mesma amostra (Figura 30). O ensaio foi realizado em sistema semi-estático, sendo as soluções teste renovadas em um intervalo de 48 horas. As

soluções-teste eram congeladas em alíquotas para preservação de substâncias potencialmente tóxicas.

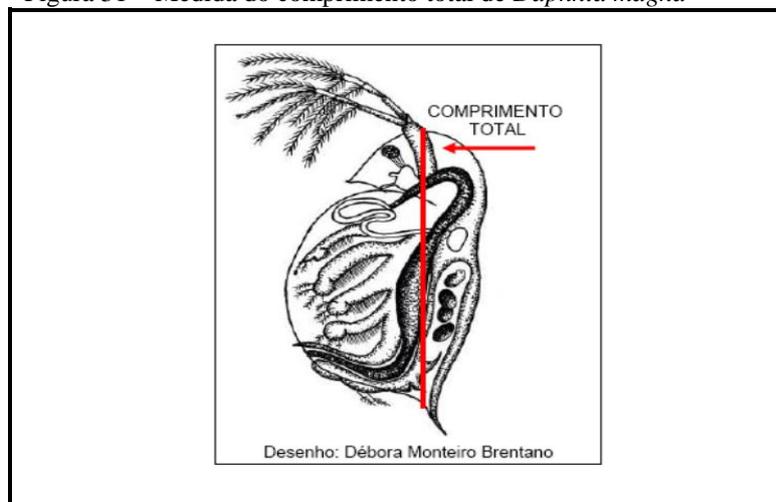
Para cada diluição foram utilizadas 10 réplicas, dispostas individualmente 10 organismos jovens de *Daphnia magna* em frascos de 100 mL, cada frasco contendo 50 mL da solução-teste. Os frascos foram cobertos com filme de PVC para evitar a evaporação e contaminação com possíveis resíduos suspensos no ar.

Os ensaios foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo. O alimento foi fornecido diariamente, ou com intervalo máximo de dois dias (nos finais de semana). O acompanhamento da sobrevivência e número de jovens gerados por fêmea foi realizado diariamente durante a primeira semana, passando para duas vezes semanais até o final do experimento.

Foram realizados ensaios crônicos para cada amostra coletada, citadas na Tabela 13. Além das amostras provenientes das ETEs foi realizado um ensaio crônico com uma solução multielementar de estrogênios (E1, E2, E2-17 A e EE2) nas concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Foram analisados quatro parâmetros durante a execução do teste: longevidade, crescimento, fecundidade e alterações morfológicas. A longevidade foi obtida pelo acompanhamento da sobrevivência dos organismos até o final do teste (21 dias), o crescimento foi avaliado também ao final do teste usando uma lâmina com escala de 1 cm e microscópio ótico com aumento de 40 vezes para medição. Considerou-se o comprimento total do indivíduo o comprimento da cabeça até a carapaça, conforme Figura 31.

Figura 31 – Medida do comprimento total de *Daphnia magna*



Fonte: BRENTANO, 2006

A fecundidade foi avaliada pela contagem dos neonatos gerados pelas fêmeas no período de 21 dias. A presença de macho, ou seja, mudança de sexo, também foi um parâmetro analisado durante o teste crônico, uma vez que os desreguladores endócrinos podem causar essa mudança.

Os resultados para longevidade, crescimento e fecundidade obtidos nas diferentes soluções-teste foram comparados aos resultados dos controles. Assim, pode-se encontrar a concentração de efeito não observado - CENO e a concentração de efeito observado - CEO. A CENO é definida como a maior concentração da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo aos organismos quando comparado ao controle, nas condições de ensaio; e a CEO é definida como a menor concentração da amostra que causa efeito estatisticamente significativo nos organismos quando comparado ao controle, nas condições de ensaio (ABNT, 2005b). A CENO e a CEO foram expressas em porcentagem para os testes dos efluentes provenientes das ETEs e em $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes realizados com os desreguladores endócrinos.

4.7.7 Análise estatística empregada para o cálculo de CENO e CEO

A avaliação de efeito tóxico na sobrevivência foi efetuada através do teste de *Fisher*. Para a avaliação de efeitos subletais nas concentrações que não afetam a sobrevivência foram realizados testes estatísticos comparando um único tratamento com o controle. Os passos adotados para análise estatística, assim como os testes utilizados para determinação de CENO e CEO estão apresentados na Figura 32 (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). O *software* utilizado para todos os testes foi o programa estatístico *SPSS Statistics 17.0*.

A fim de avaliar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de *Shapiro Wilks*, o qual é recomendado quando o número total de amostra é igual ou inferior a 50. Quando os dados avaliados seguiam uma distribuição normal, ou seja, eram não significativos ($p \geq 0,05$), utilizava-se um teste paramétrico³ (Teste “t”) de comparação entre os grupos, a fim de estimar se a diferença entre as médias do controle e das concentrações eram estatisticamente significativas, ou seja, para $p < 0,05$ o efeito era tóxico, pois havia diferença significativa. Quando $p \geq 0,05$, não havia toxicidade para a concentração avaliada. Concomitante ao teste

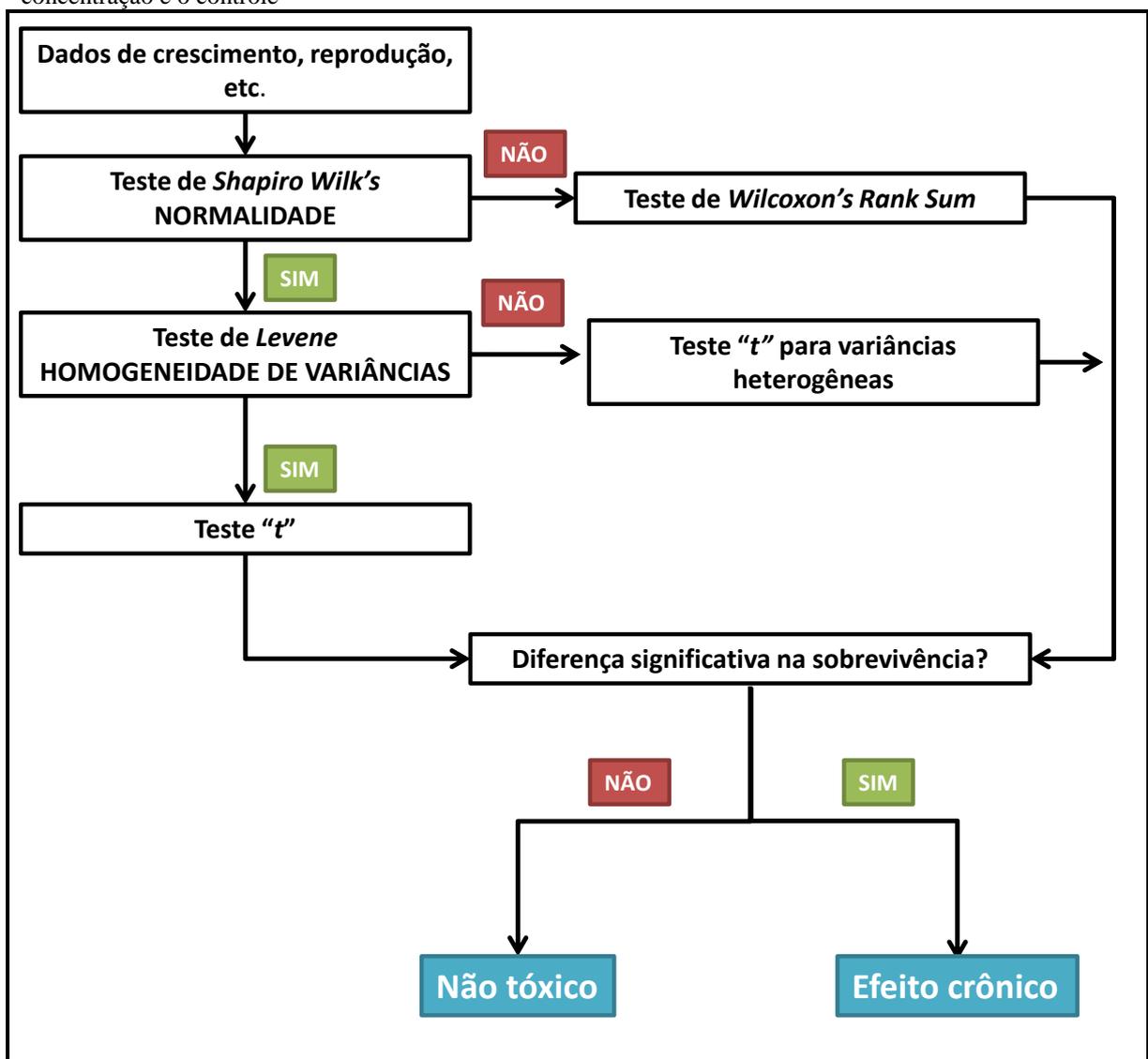
³ Teste paramétrico é um teste estatístico que considera uma distribuição característica, em geral a curva normal, e outras suposições sobre o conjunto de dados na determinação ou estimativa de uma estatística desejada. Em geral, são mais restritivos já que necessitam de um maior número de suposições atendidas.

paramétrico, também se avaliou a homogeneidade da variância entre os grupos por meio do teste *Levene*, $p \geq 0,05$ para variâncias homogêneas e $p < 0,05$ para variâncias heterogêneas.

Quando o teste de normalidade apresentava valor $p < 0,05$, ou seja, o grupo de dados não seguiam uma distribuição normal, era necessário aplicar um teste não paramétrico⁴, teste de *Wilcoxon's Rank Sum*, para avaliar o efeito tóxico entre os grupos nas diferentes concentrações avaliadas.

Para análise estatísticas dos dados de reprodução foi utilizado o número de organismos gerados por *Daphnia* adulta, sendo realizada para todos os testes a comparação de um único tratamento, no caso concentração, com o controle.

Figura 32 – Fluxograma para análise estatística de dados de testes de toxicidade crônica com uma única concentração e o controle



Fonte: Adaptado de ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008

⁴ Teste não paramétrico é um procedimento estatístico que independe das hipóteses restritivas dos testes paramétricos. Especificamente, eles não presumem que os dados tenham distribuição normal.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método analítico

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados do tempo de retenção (t_R) dos analitos e da relação massa/carga (m/z) obtidos durante a implementação do método de análise para os DEs e para o micropoluente colesterol.

Tabela 17 – Parâmetros qualitativos (tempo de retenção e íons de quantificação) utilizados na determinação dos hormônios

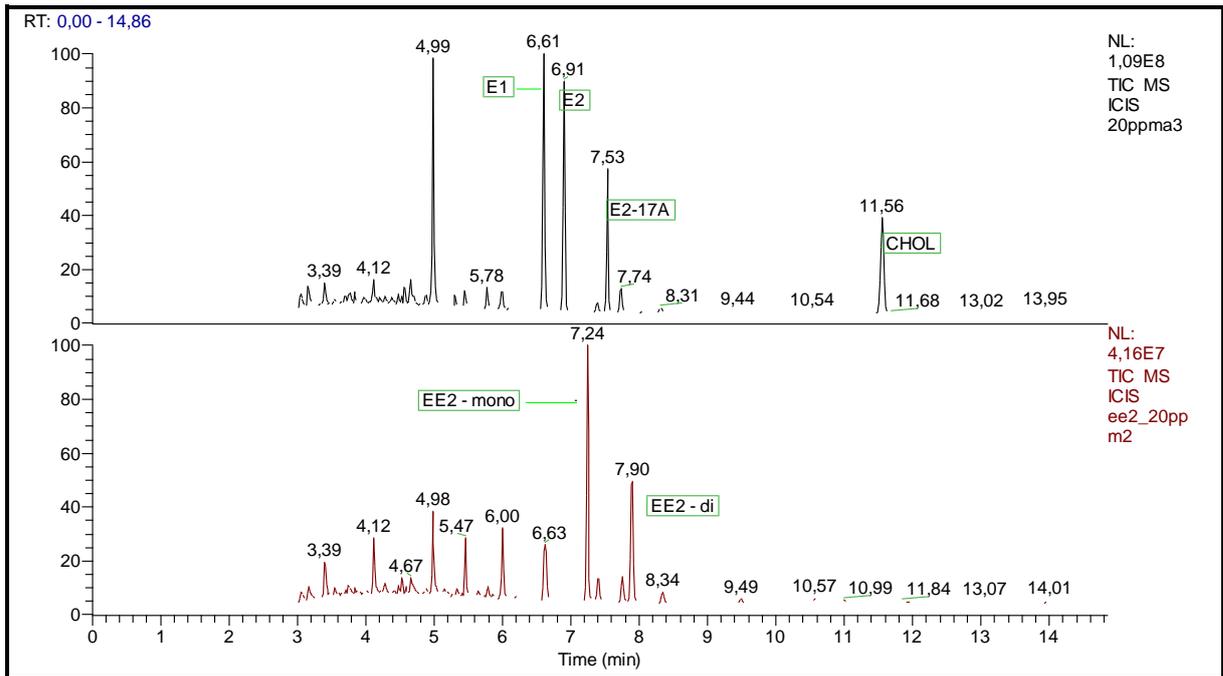
Composto	t_R (min)	t_R (min)	m/z	m/z	m/z
	OV-5MS	SLB-5MS			
E1	6,66	10,91	218	257	342
E2	6,95	11,34	285	326	416
E2-17A	7,57	11,93	244	297	386
EE2 (mono derivatizado)	7,24	11,75	285	342	368
EE2 (di derivatizado)	7,88	-	285	425	440
CHOL	11,56	17,10	255	368	458

Fonte: AUTORA, 2012

Os resultados obtidos para o tempo de retenção dos compostos foram menores do que os obtidos por de Mes (2007) e Quintana (2004) em condições semelhantes de rampa de aquecimento e demais parâmetros operacionais do CG/MS, o que torna o método desenvolvido mais economicamente viável, uma vez que o consumo do gás de arraste seria reduzido devido à menor demanda de tempo de corrida. Além do t_R , a relação massa/carga (m/z) encontrada para os compostos derivatizados é condizente com o encontrado por de Mes (2007) e Noppe (2006).

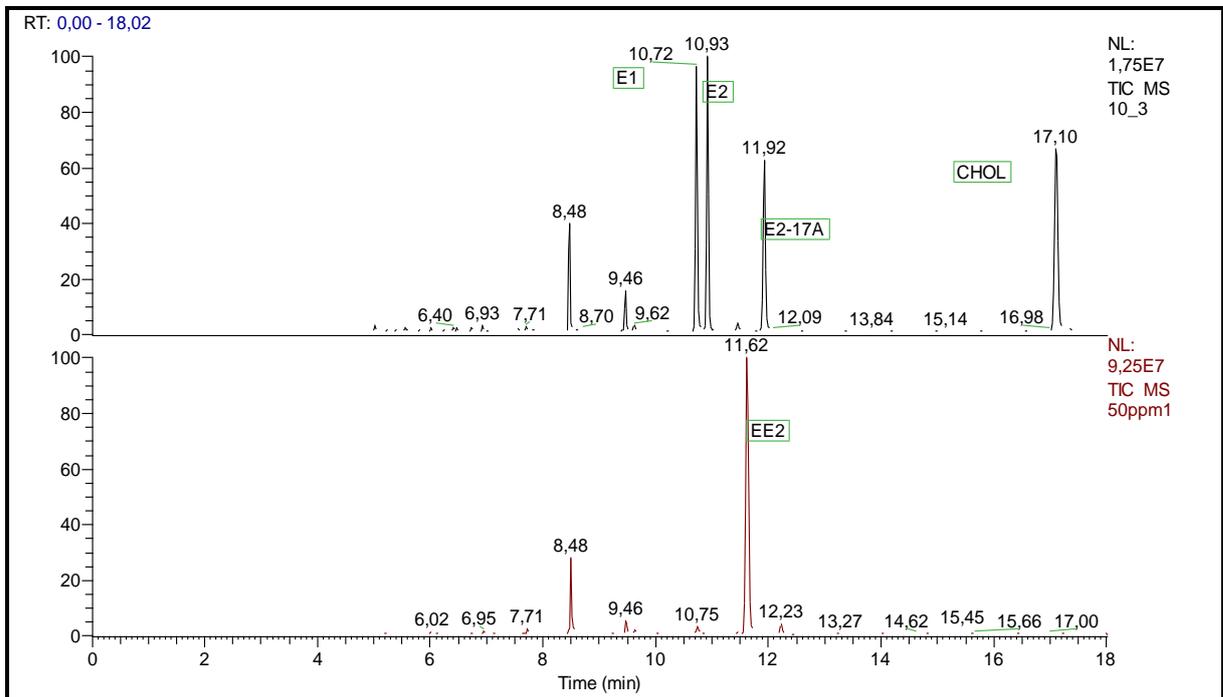
Nas Figuras 33 e 34 são apresentados os cromatogramas dos micropoluentes obtidos em duas colunas distintas.

Figura 33 – Cromatograma obtido da solução padrão multielementar de hormônios utilizando a coluna OV-5MS



Fonte: AUTORA, 2012

Figura 34 – Cromatograma obtido da solução padrão multielementar de hormônios utilizando a coluna SLB-5MS



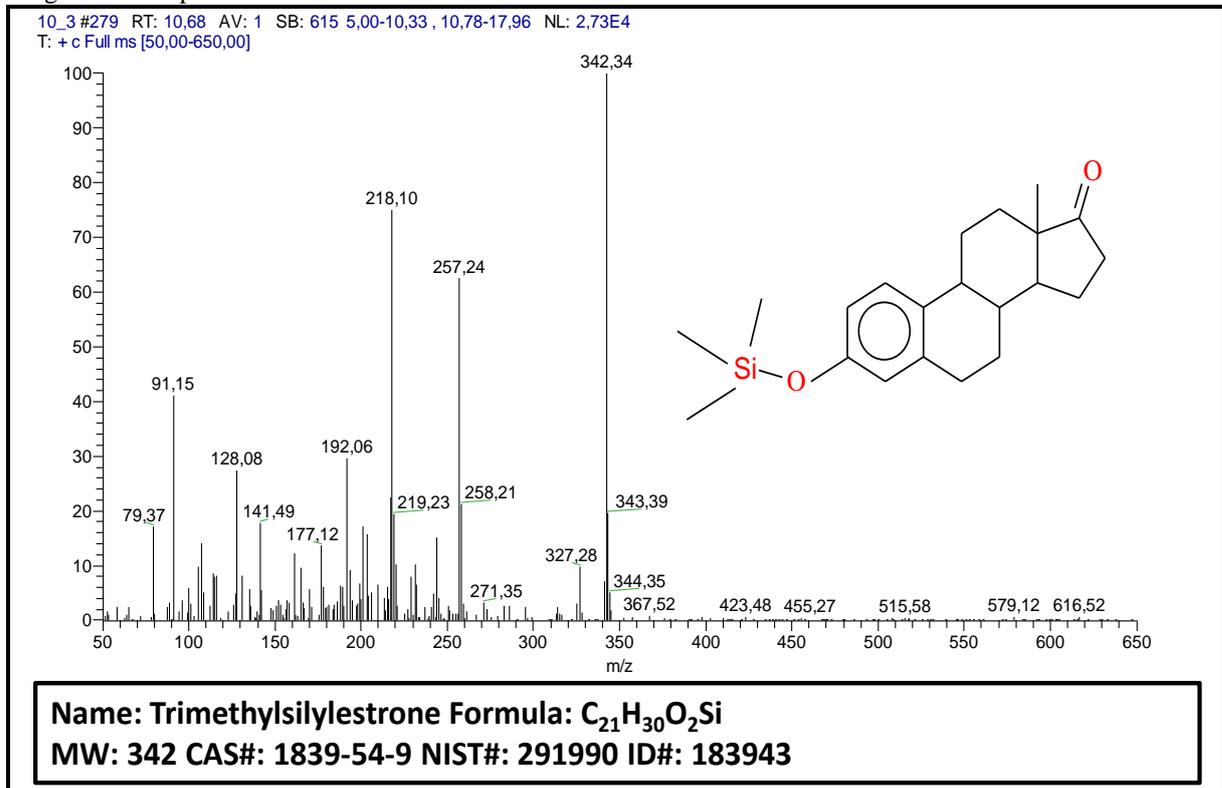
Fonte: AUTORA, 2012

A partir dos cromatogramas apresentados observa-se que os picos dos compostos exibem separação satisfatória, uma vez que não há coeluição dos picos. Essa separação dá-se principalmente pela eficiência de colunas capilares utilizadas em cromatografia gasosa

(McNAIR; MILLER, 2009). A separação dos compostos pode ser avaliada em dados numéricos em termos de resolução os resultados obtidos para E1 e E2 foram 2,4 para coluna OV-5MS e 1,66 para SLB-5MS, os valores >1,5 indicam que a separação dos compostos foi completa para as duas colunas utilizadas na pesquisa. No entanto, a coluna SLB-5MS apresentou uma maior eficiência de separação, uma vez que o número de pratos teóricos (N) foi de 183.869 contra 48.546 para a coluna OV-5MS, o N foi calculado utilizando os dados para o E1.

Nas Figuras 35 a 40 são apresentados os espectros de massa (MS) obtidos a partir da injeção de solução padrão multielementar durante a análise cromatográfica dos hormônios derivatizados com BSTFA.

Figura 35 – Espectro de massa do E1 derivatizado com BSTFA



Fonte: AUTORA, 2012

Figura 36 – Espectro de massa do E2 derivativado com BSTFA

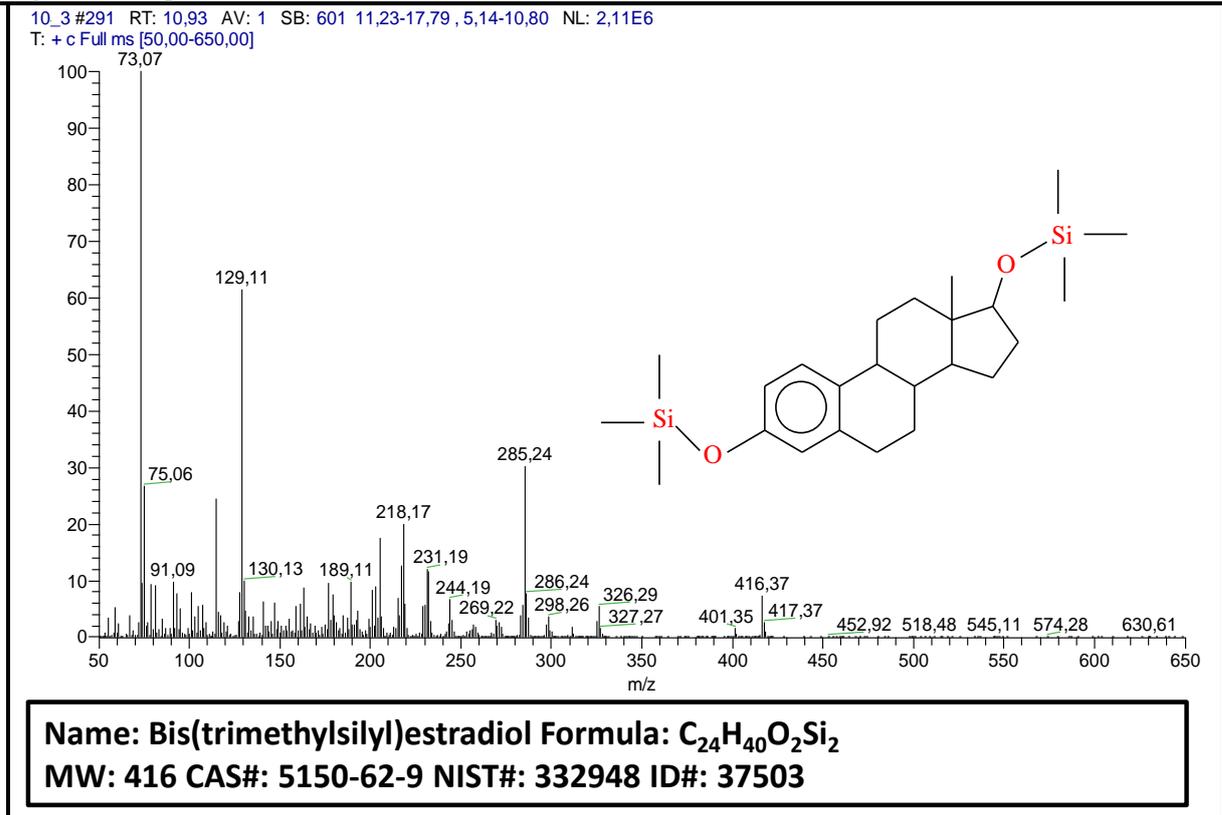


Figura 37 – Espectro de massa do E2-17A derivativado com BSTFA

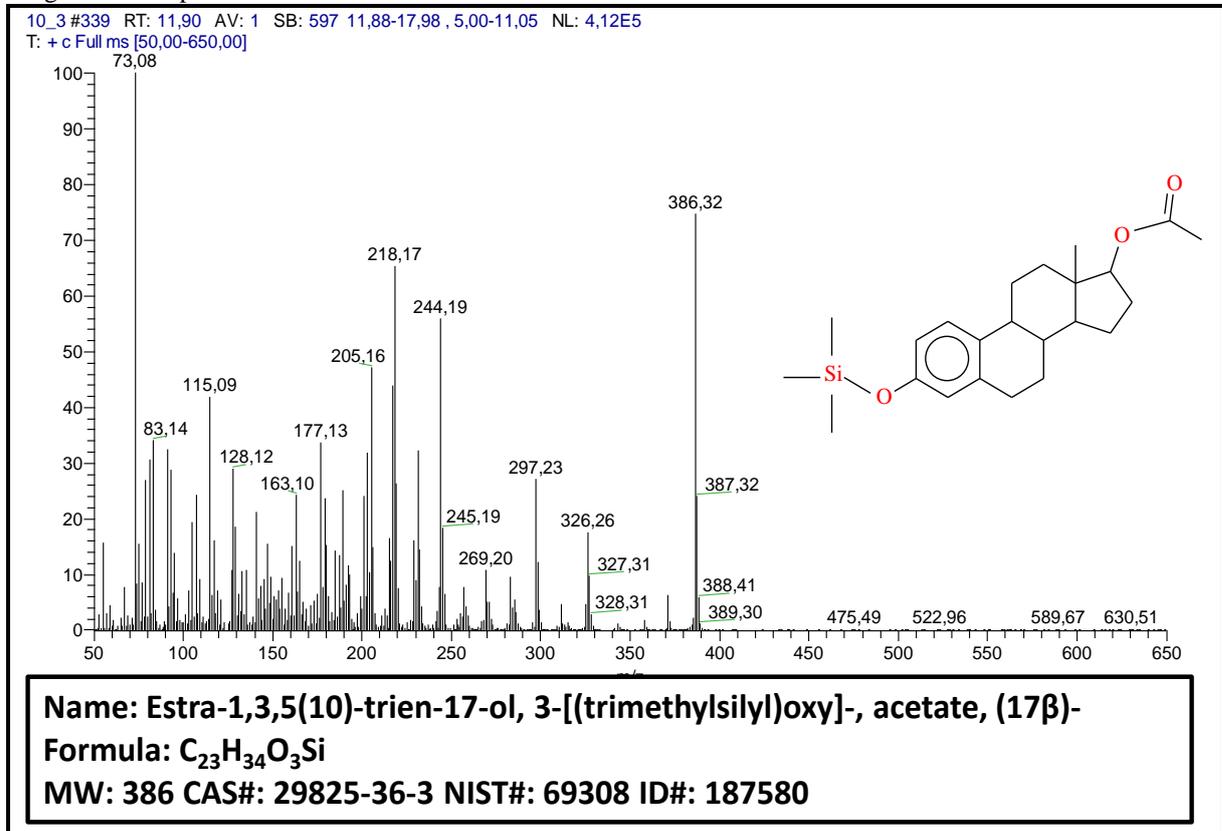
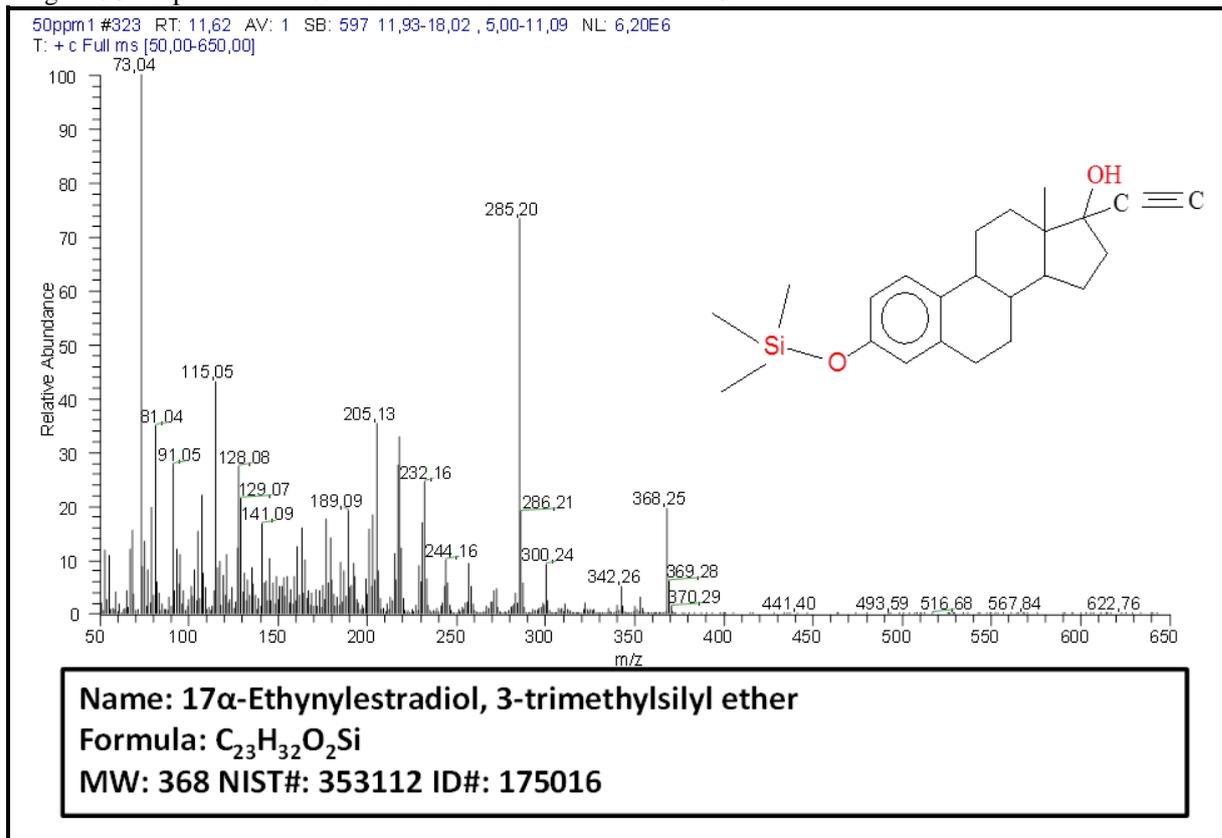
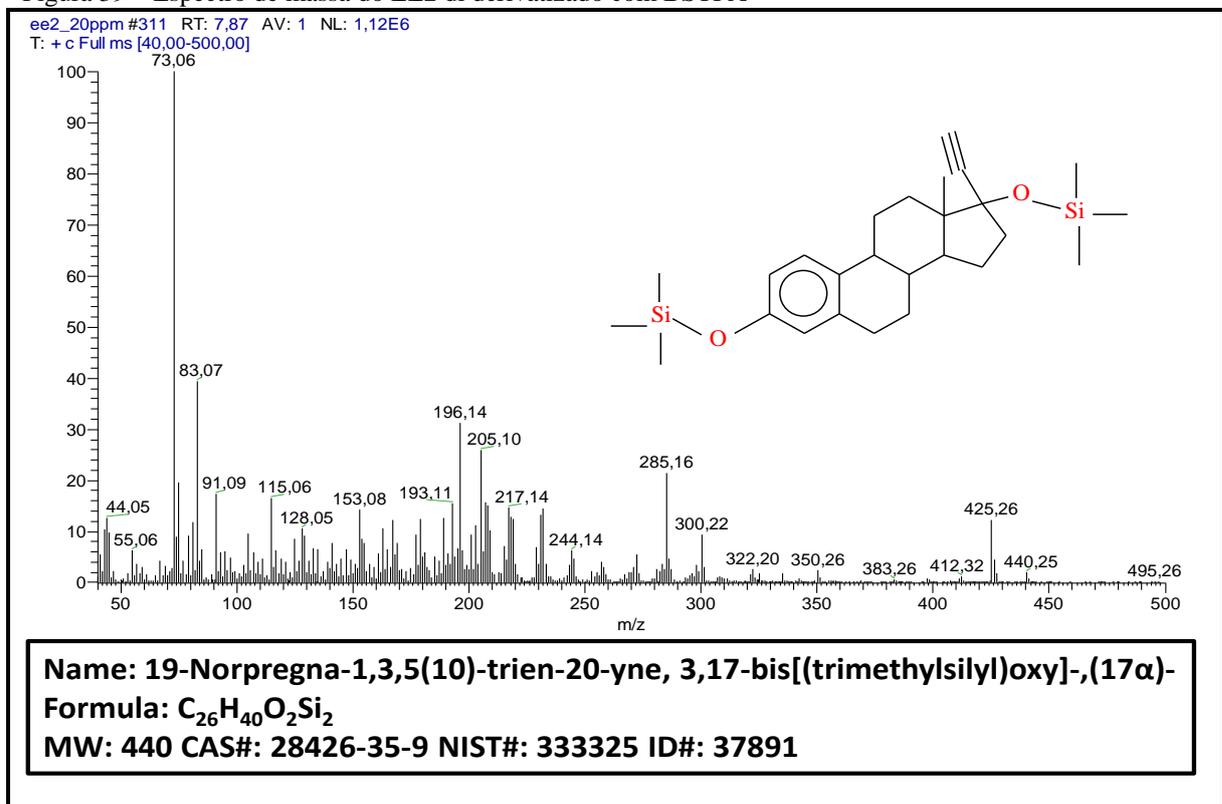


Figura 38– Espectro de massa do EE2 mono derivatizado com BSTFA



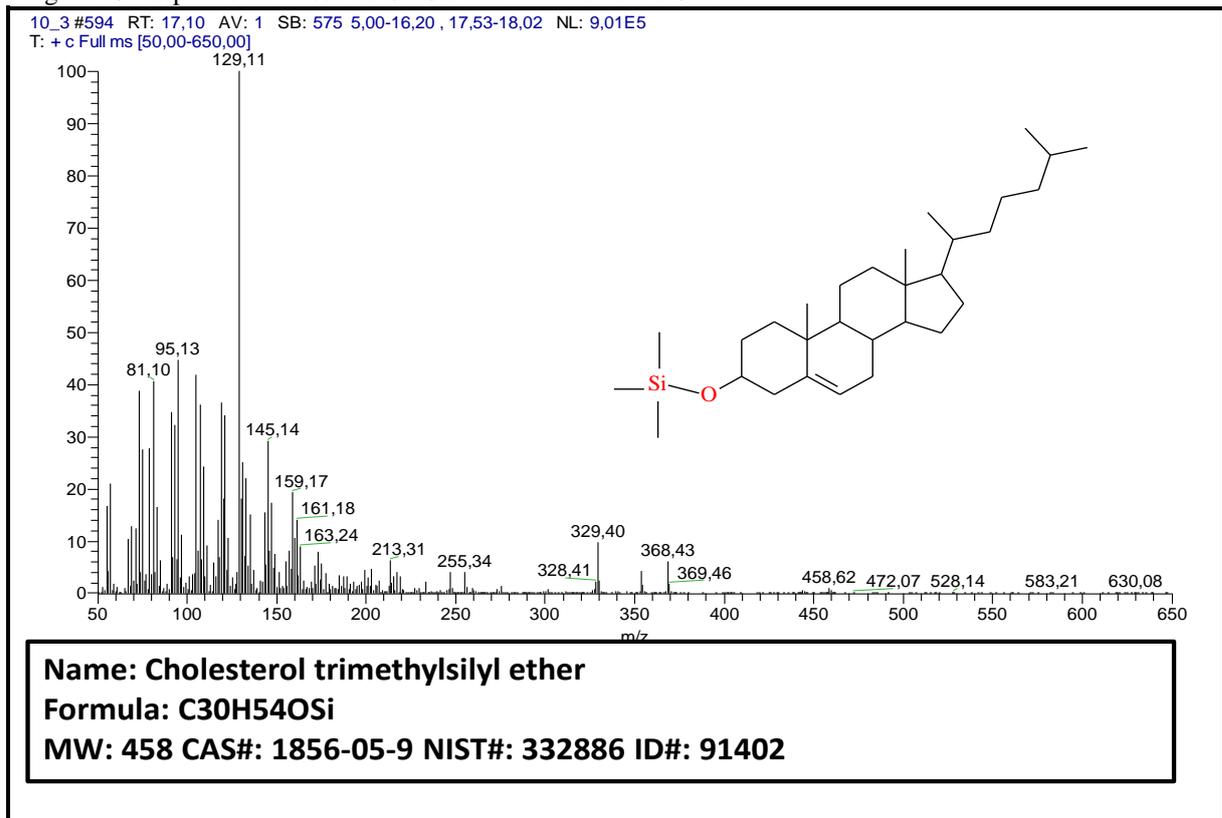
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 39 – Espectro de massa do EE2 di derivatizado com BSTFA



Fonte: AUTORA, 2012

Figura 40– Espectro de massa do CHOL derivatizado com BSTFA



Fonte: AUTORA, 2012

Os espectros de massa das soluções padrões são semelhantes aos reportados por Azzouz *et al.* (2010), Lerch e Zinn (2003). A porcentagem de confiabilidade para a identificação dos espectros de massa obtida foi maior que 97%, indicando que os compostos foram eficientemente derivatizados, uma vez que os hormônios derivatizados foram identificados pela biblioteca internacional NIST com êxito.

5.2 Validação do Método Analítico

Na Tabela 18 estão apresentados os resultados obtidos durante a análise de precisão dos compostos.

Tabela 18 – Precisão do método cromatográfico empregando área e tempo de retenção dos compostos na concentração 50 ppb ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). n=10

Composto	CV(%) Área	CV(%) t_R
E1	16,84	0,10
E2	16,21	0,13
E2-17A	18,21	0,10
EE2	20,48	0,28
CHOL	12,87	0,08

Fonte: AUTORA, 2012

Legenda: CV%: Coeficiente de variação

A partir da Tabela 18 pode ser verificado que a repetibilidade do método variou de 0,08% a 0,28% para o tempo de retenção (análise qualitativa) e 12,87% a 20,48% para a área do pico (análise quantitativa), demonstrando uma precisão satisfatória, haja vista que todos os analitos apresentaram CV% dentro da faixa predita pela AOAC (1998), que determina que para a faixa de concentração entre 100-10 ppb os valores de CV% devem estar na faixa de 15-21%, portanto como a concentração dos analitos analisadas foi de 50 ppb os valores obtidos encontram-se dentro da faixa determinada.

Na Tabela 19 está apresentado o resultado de linearidade obtido durante a realização das curvas analíticas dos hormônios, observado através do coeficiente de correlação (R) das curvas de calibração e o número de pontos utilizados (N) para a realização da curva. Os valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) instrumentais dos hormônios esteróides também são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Parâmetros de linearidade obtidos na validação do método analítico instrumental para os hormônios

Composto	R	N	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD (ng L^{-1})	LQ (ng L^{-1})
E1	0,9937	10	10,0 – 1000	35,38	117,92
E2	0,9928	10	10,0 – 1000	11,28	37,58
E2-17A	0,9930	8	10,0 – 1000	18,90	62,99
EE2	0,9970	5	10,0 – 1000	1416,43	4721,44
CHOL	0,9900	9	10,0 – 1000	1065,98	3553,28

Fonte: Autora, 2012

Legenda:

R: coeficiente de correlação linear

N: número de pontos utilizados para a curva de calibração

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

Percebe-se que para todos os estrogênios, o valor de R foi superior a 0,99, o que atende as exigências da ANVISA (BRASIL, 2003), ou seja, valores de R igual ou superior a 0,99.

Azzouz *et al.*(2010) encontraram valores menores de LD para os estrogênios, variando de 0,05-0,06 ng L^{-1} . Andrási *et al.* (2011) encontraram valores de LQ semelhantes aos obtidos durante a pesquisa, variando de 1,88 ng L^{-1} e 37,5 ng L^{-1} . O limite de quantificação obtidos para E1, E2 e EE2 determinados por essa metodologia foram inferiores aos encontrados por Quintana *et al.* (2004), os quais utilizaram CG/MS para identificação. Os autores encontram valores que variaram de 10-17 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os resultados obtidos de recuperação utilizando o cartucho DSC-18 são apresentados na Tabela 20. Já na Tabela 21 estão apresentados os resultados obtidos na análise da eficiência do cartucho Oasis HLB.

Tabela 20 – Recuperação (%) dos estrogênios utilizando cartucho DSC-18, concentração 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, matriz efluente sanitário.

Composto	Recuperação (%)
E1	73,4
E2	52
E2-17A	105
EE2	99
Colesterol	ND

Fonte: AUTORA, 2012

Tabela 21 – Recuperação (%) dos hormônios utilizando cartucho Oasis HLB, concentração 500 ng L⁻¹, matriz efluente sanitário, n=2.

Composto	Recuperação (%)	DP
E1	76	±0,04
E2	66	±0,11
E2-17A	42	±0,50
EE2	69	±0,58
Colesterol	54	±0,76

Fonte: AUTORA, 2012

Segundo a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (1998), o valor aceitável de recuperação dependerá do percentual de analito que foi adicionado em relação à amostra como um todo, relação m/v de analito, que para a faixa de concentração adicionada à amostra em estudo, 500 ng L⁻¹, o percentual massa/volume será de 10⁻⁹ %, o que resulta em uma faixa de recuperação aceitável de 40 a 120%, conforme exposto na Tabela 4 (p.40), o que torna a recuperação satisfatória para todos os analitos analisados. Para a concentração de 2 µg L⁻¹ (10⁻⁷ %) a faixa seria de 80-110%, apresentando resultados insatisfatórios para os estrogênios E1 e E2.

Os valores de recuperação dos analitos para o cartucho Oasis HLB são menores do que os apresentados por alguns autores que utilizaram como matriz efluente sanitário adicionando baixas concentrações de estrogênios e utilizaram o mesmo tipo de cartucho (SALVADOR *et al.*, 2007; TRENHOLM *et al.*, 2006; BENIJTS *et al.*, 2004; LAGANÀ *et al.*, 2004). Vega-Morales *et al.* (2012) encontraram uma recuperação na faixa de 88-98% para concentração de 500 ng L⁻¹ de analitos. No entanto, os autores Abegglen *et al.* (2009) encontraram uma recuperação para o composto EE2 de 77%, valor aproximado do obtido (69%) durante essa pesquisa para o cartucho polimérico.

Pedrouzo *et al.* (2009) encontraram faixas de recuperação semelhantes à da presente pesquisa utilizando os seguintes parâmetros: matriz esgoto sanitário, cartucho Oasis HLB e estrogênios na concentração de 300 ng L⁻¹, as eficiências de recuperação pelos autores foram: 51% (E1), 61%(E2), 26% (E2-17A) e 52% (EE2).

Os índices de recuperação estão intimamente relacionados com o desenvolvimento do método de preparo da amostra, incluindo a etapa de filtração, por exemplo, de Graaff *et al.* (2011) atribuíram os baixos índices de recuperação encontrados em afluente/efluente à adsorção dos analitos na etapa de filtração da amostra em papéis de fibra de vidro, etapa preliminar à SPE. Os autores compararam o índice de recuperação dos

estrogênios em água Milli-Q e na matriz de água negra (*black water* – constituído apenas de fezes e urina), os resultados da adsorção para BW foram: E1 -26%; E2-64%; EE2-35%, no entanto os autores não conseguiram explicar porque em outros efluentes não ocorria a mesma adsorção. Essa informação necessita ser confirmada realizando ensaios com efluentes de ETEs e outros materiais de papéis de filtro devem ser testados com o objetivo de aumentar o índice de recuperação dos analitos.

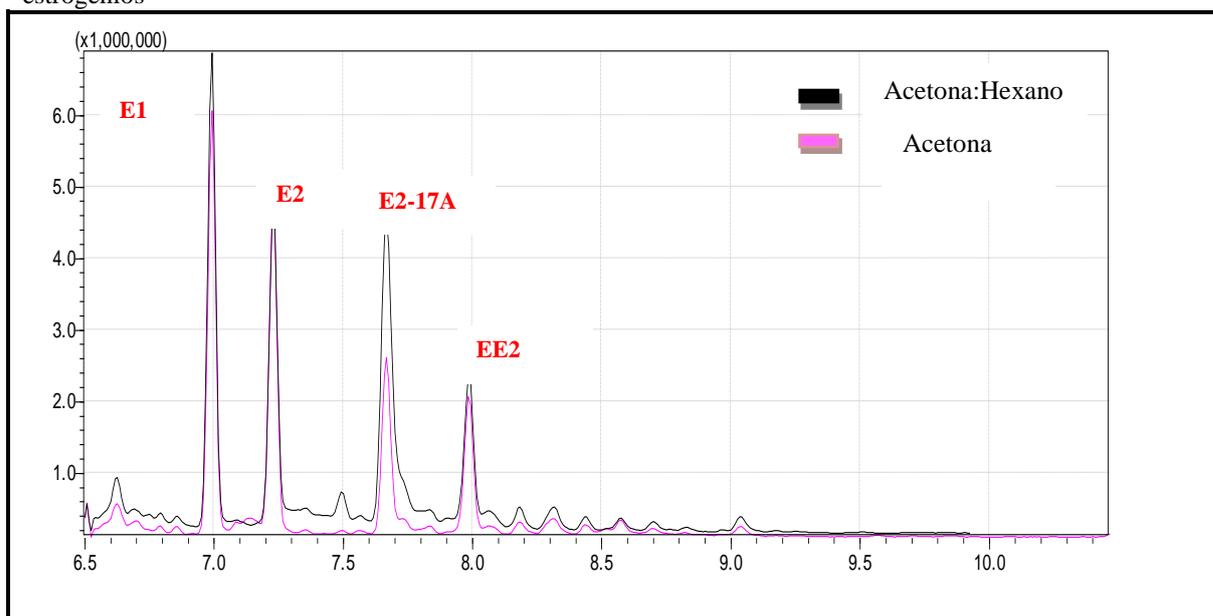
Diante dos resultados obtidos, é recomendado que sejam realizados mais ensaios em diferentes concentrações, a fim de observar se o resultado se mantém constante, além de determinar o LD do método. Segundo BRASIL (2003), se o método obtiver boa precisão, podem ser aceitáveis baixas recuperações.

5.3 Otimização da Etapa de Concentração dos Analitos - Extração em Fase Sólida (SPE)

5.3.1 Estudo do eluente

Na Figura 41 está apresentado o cromatograma obtido durante a análise de eluente para os micropoluentes. Na Tabela 22 são apresentados os resultados em termos de recuperação (%) obtidos na comparação dos solventes para eluição na etapa de SPE.

Figura 41 – Cromatograma de comparação dos eluentes acetona e acetona:hexano realizado para os estrogênios



Fonte: AUTORA, 2012

Tabela 22 – Eficiência de recuperação de estrogênios (%) comparando os eluentes acetona e acetona:hexano (50:50, v/v), na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, com cartucho DSC-18

Composto	Acetona	Acetona:Hexano
E1	120	120
E2	69,5	68,4
E2-17A	48,8	115,4
EE2	75	90

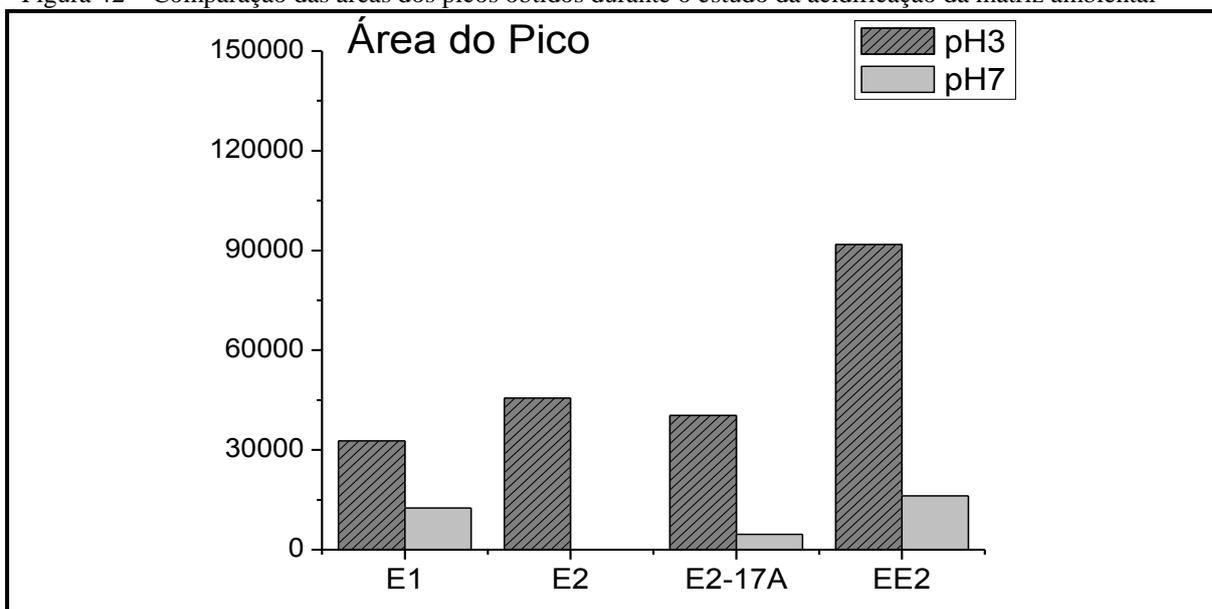
Fonte: AUTORA, 2012

Durante a análise dos eluentes, observou-se que a mistura acetona:hexano (50:50, v/v) foi mais eficiente para todos os compostos quando comparada à acetona, como pode ser observado na Figura 41, exceto para o E2. Em processos de separação envolvendo adsorção de compostos moderadamente polares em fases sólidas deve-se empregar solventes com valores de ϵ° (valor eluotrópico) inferiores a 0,4 (LANÇAS, 2004). Percebe-se que os analitos analisados apresentaram resultados de recuperação dentro da faixa recomendada por Lanças (2004), de 70-120%, em que apenas E2 apresentou uma recuperação inferior a 68,4%. O composto E2-17A apresentou uma recuperação de 115% quando utilizado como eluente a mistura acetona: hexano (50:50, v/v). Devido aos valores do coeficiente octanol-água ($\log K_{ow}$ entre 3,5 e 5), os estrogênios analisados são considerados de média a baixa polaridade, sendo o E2-17A o composto de menor polaridade ($\log K_{ow}$ 4,95) e, portanto, o que apresentava uma maior afinidade com a fase móvel acetona:hexano, a qual possuía menor polaridade. Deve ser observado que o material adsorvente utilizado é sílica modificada, ou seja, não possui muita interação com o analito, portanto, ao analisar outro material adsorvente devem ser testados outros tipos de eluentes.

5.3.2 Estudo da acidificação da amostra ambiental

Os resultados obtidos durante a avaliação do efeito do pH na matriz ambiental são apresentados na Figura 42.

Figura 42 – Comparação das áreas dos picos obtidos durante o estudo da acidificação da matriz ambiental



Fonte: AUTORA, 2012

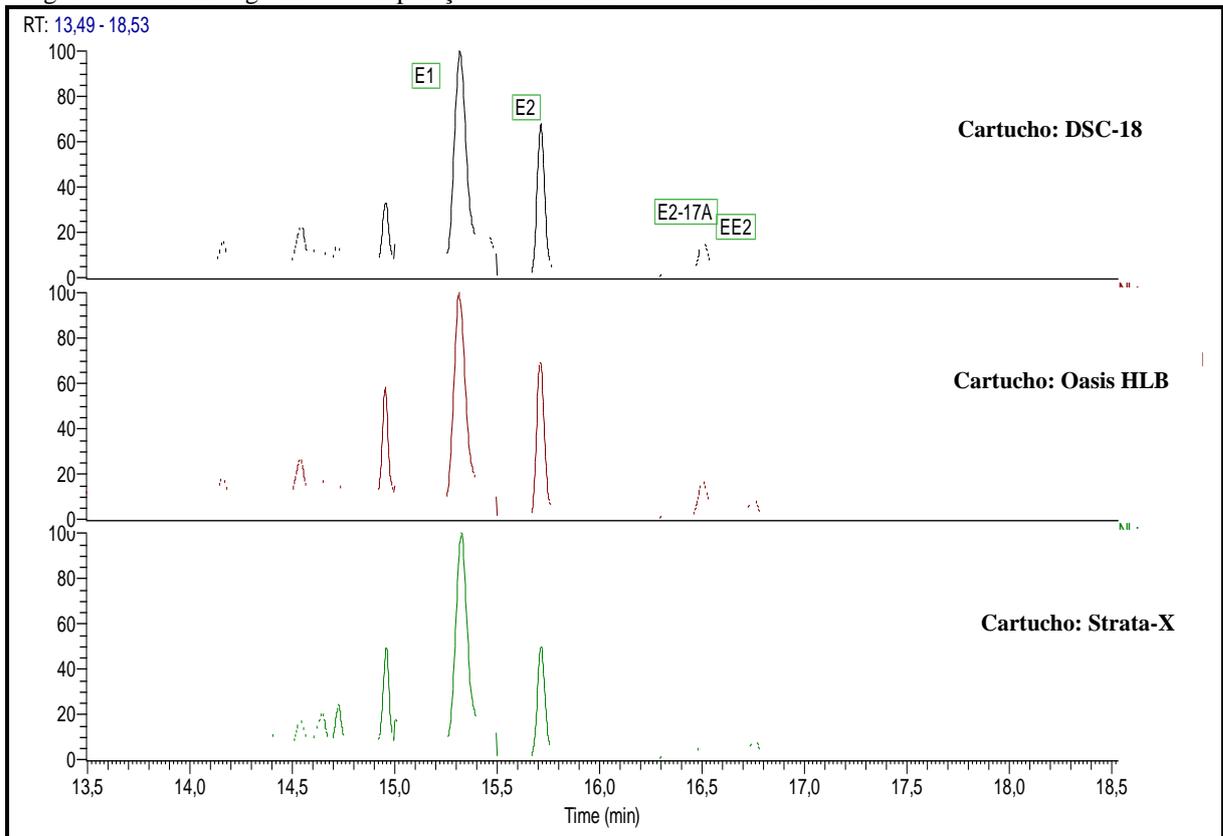
Diante dos resultados, observa-se que a matriz ambiental com pH 3 apresentou uma melhor eficiência na etapa de extração dos analitos em relação à amostra em seu pH original (pH 7). A acidificação da amostra é desejável para diminuir a dissociação de analitos fracamente ácidos (pK_a 10,2-10,5), o que pode aumentar a eficiência de extração devido à interação mais forte dos íons não dissociados, ou seja, do estrogênio em sua forma molecular, com o material adsorvente contido no cartucho de SPE (LIU *et al.*, 2004).

O resultado obtido indicando a acidificação é condizente com a recomendação reportada no método 1694 da USEPA (2007), o qual descreve na metodologia a acidificação da amostra para $pH < 2$. Substâncias húmicas, presentes em efluentes sanitários, são melhores extraídas a um baixo valor de pH, conforme reportado por Bizkarguenaga *et al.* (2012).

5.3.3 Avaliação dos materiais adsorventes

Os resultados da comparação dos materiais adsorventes utilizado na SPE podem ser visualizados na Figura 43 e na Tabela 23.

Figura 43 – Cromatograma de comparação dos materiais adsorventes avaliados.



Fonte: AUTORA, 2012

Tabela 23 – Eficiência de recuperação dos analitos durante a avaliação dos materiais adsorventes

Compostos/ Cartuchos	Recuperação (concentração) (%)	DP	CV(%)
DSC-18®			
E1	98,50	±0,05	5,02
E2	100,83	±0,04	3,97
E2-17A	100,33	±0,02	2,34
EE2	74,50	±0,29	38,91
Oasis HLB®			
E1	97,17	±0,04	4,12
E2	101,00	±0,03	3,26
E2-17A	95,33	±0,02	2,47
EE2	93,00	±0,10	10,64
Strata-X®			
E1	96,33	±0,02	1,95
E2	97,50	±0,02	2,17
E2-17A	94,33	±0,00	0,49
EE2	118,00	±0,45	38,35

Fonte: AUTORA, 2012

Diante dos resultados obtidos em termos de recuperação percebe-se que não há uma diferença significativa entre os cartuchos, no entanto para o composto EE2 as taxas de recuperação para os materiais poliméricos (Oasis HLB e Strata-X) foram significativamente maiores quando comparado ao material empregando sílica modificada (DSC-18).

Liu *et al.* (2004a) analisaram diversos tipos de materiais adsorventes visando um alto valor de recuperação dos contaminantes, sendo que o cartucho que apresentou melhor recuperação foi o Oasis HLB, chegando a um valor de 118% para os estrogênios E1, E2 e EE2. O cartucho DSC-18 da Supelco®, o qual emprega sílica modificada, também apresentou valores aceitáveis de recuperação, maiores que 80% (Liu *et al.*, 2004a).

Esse resultado pode ser confirmado por Ghiselli (2006) e por Huang *et al.* (2011), os quais encontraram valores ótimos de recuperação (82-95%) utilizando cartucho Oasis HLB. Quando grupos hidrofílicos, como *N*-vinilpirolidona, são adicionados aos sorbentes poliméricos, estes tornam o material mais efetivo na retenção do analito, especialmente para amostras ambientais (SALVADOR *et al.*, 2007). A maior eficiência dos materiais poliméricos pode ser atribuída ao tipo de interação entre o analito e o sorbente. Este fato é atribuído porque a superfície do grupo hidrofílico contém um número maior de sítios aromáticos, o que permite interações do tipo π - π , enquanto que a interação do grupo funcional do analito e a sílica modificada (C-18) seja devido às forças do tipo *van der Waals* (MASQUÉ *et al.*, 1998).

5.3.4 Planejamento Fatorial para SPE

Devido aos resultados obtidos na avaliação dos materiais adsorventes, foram selecionados os cartuchos Oasis HLB® e Strata-X® para a realização do planejamento fatorial.

A matriz dos experimentos e os vetores de resposta (valores médios das áreas dos picos cromatográficos) obtidos pelo planejamento fatorial com 16 ensaios (quatro fatores em dois níveis) são apresentados na Tabela 24.

Com os resultados obtidos pelo *Statgraphics® Centurion XV* foram gerados os diagramas de Pareto para cada composto, com intervalo de confiança de 95%, os quais são mostrados na Figura 44.

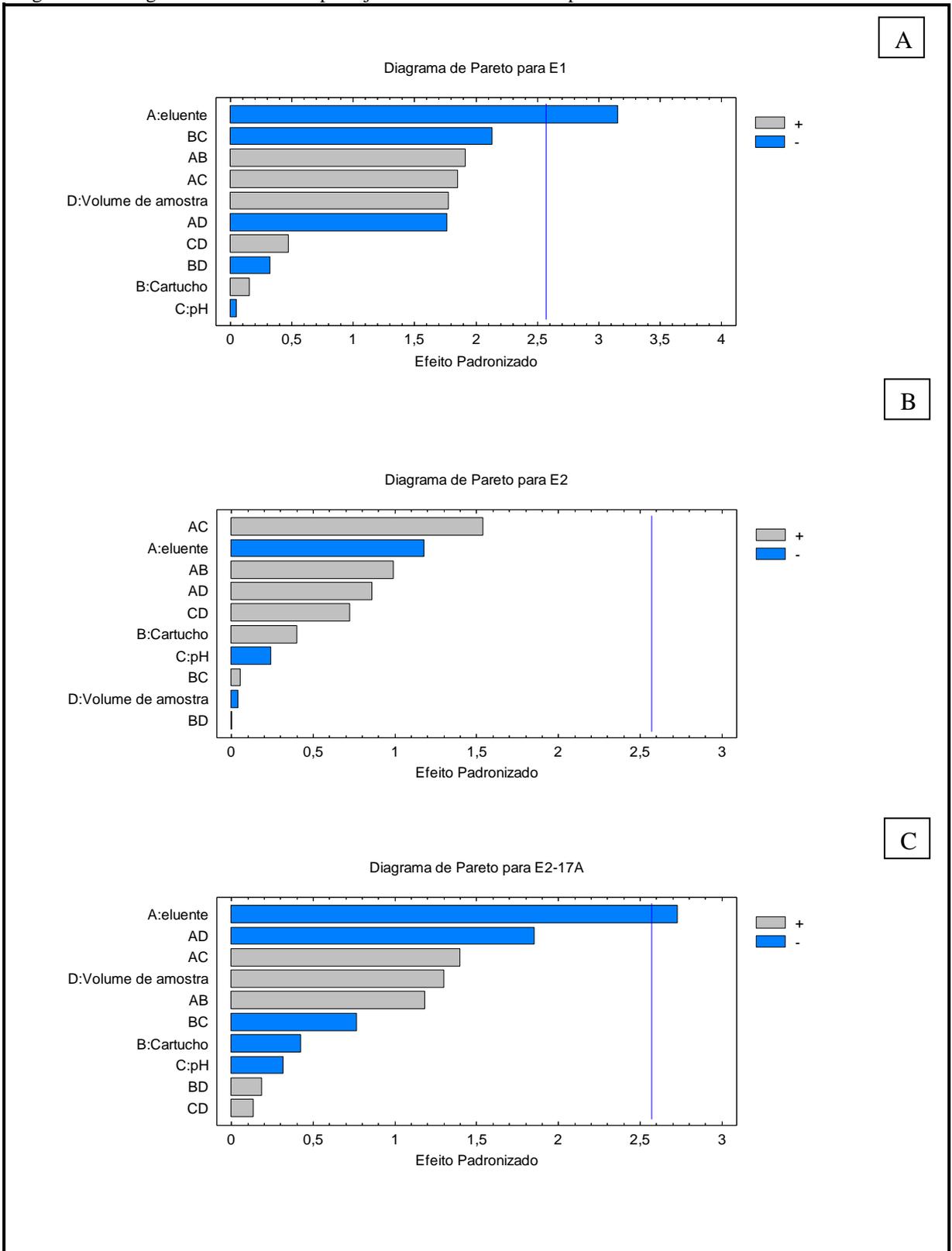
Tabela 24 – Matriz para o planejamento fatorial (2⁴) e áreas dos picos dos cromatogramas obtidos para o método de extração dos hormônios por SPE e análise por GC/MS

Ensaio	Eluente	Cartucho	pH	Volume, mL	E1	E2	E2-17A	EE2	CHOL
1	B	Strata-X	7	250	146820	11431	31527	18732	1703
2	B	Strata-X	7	500	149871	50145	26795,5	10609	1978
3	B	Oasis HLB	7	250	148880	6459	61358	8201,5	1534
4	A	Strata-X	7	250	38299,5	0	10440	4021	3244
5	B	Oasis HLB	7	500	85686	1501	13842,5	8603,5	3112
6	A	Strata-X	3	500	271769,5	8140,5	61038,5	17213	4562
7	A	Strata-X	7	500	149787,5	10027	68483	18199	1978
8	B	Oasis HLB	3	500	7048	1021	0	0	1934
9	A	Oasis HLB	3	500	274772	39910	106476	40349,5	11409
10	B	Oasis HLB	3	250	22294	1745	9322	5530,5	2293
11	A	Oasis HLB	7	250	131887	28830	27416	19990	9916
12	A	Oasis HLB	7	500	391843,5	14927,5	98080	50955,5	3562
13	A	Oasis HLB	3	250	166438	21898,5	60879	28157,5	7322
14	A	Strata-X	3	250	261680	61631	67333	20582,5	6710
15	B	Strata-X	3	500	164683,5	6375,5	49452	26683	4308
16	B	Strata-X	3	250	87979,25	3642	17173	17617,5	3579

Fonte: AUTORA, 2012

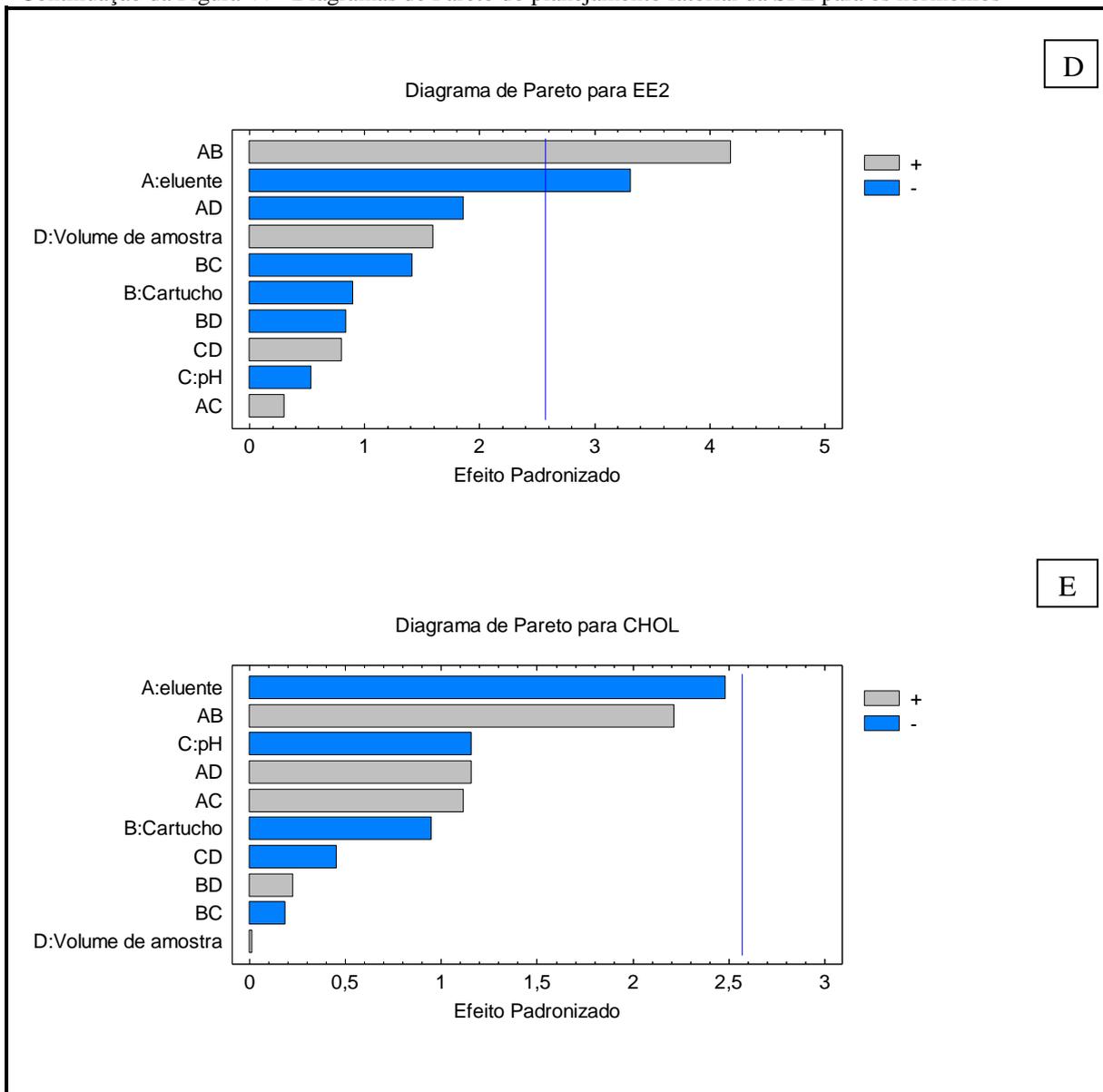
Legenda: A)MeOH; B)MeOH: Acetona (60:40, v/v)

Figura 44 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da SPE para os hormônios



Fonte: AUTORA, 2012

Continuação da Figura 44 - Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da SPE para os hormônios



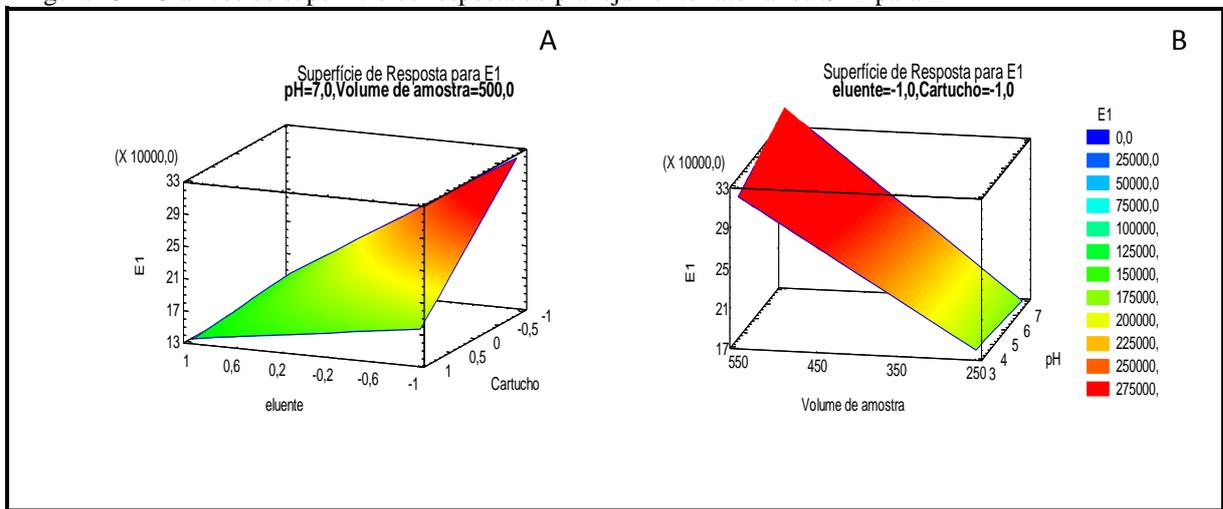
Fonte: AUTORA, 2012

Para os analitos E1, E2-17A e EE2 (Figura 44 a, c e d) o fator que apresentou importância significativa foi o tipo de eluente empregado, apresentado p -valor de 0,0251, 0,0414 e 0,0212, sendo o que sofreu maior impacto foi o EE2 (Figura 44 d), observando ao seu menor p -valor. Observa-se que há uma interação negativa em termos de eluente para todos os compostos analisados, ou seja, no momento que havia a transferência do nível baixo -1 (A) para o alto +1 (B) ocorria uma redução no fator resposta, mostrando que o eluente A (MeOH) apresentou uma melhor eficiência quando comparado ao eluente B (Mistura MeOH+Acetona) (Figura 44). Para o E2 (Figura 44b) não houve nenhum efeito significativo

para nenhum dos fatores analisados, sendo a interação eluente e pH a de maior influência quando comparada aos demais fatores (p -valor 0,1842). O fator que apresentou maior significância para o composto EE2 foi a interação entre o tipo de cartucho e o eluente (p -valor 0,0086) (Figura 44d). Para o composto CHOL os fatores analisados não apresentaram efeitos com significância (Figura 44e).

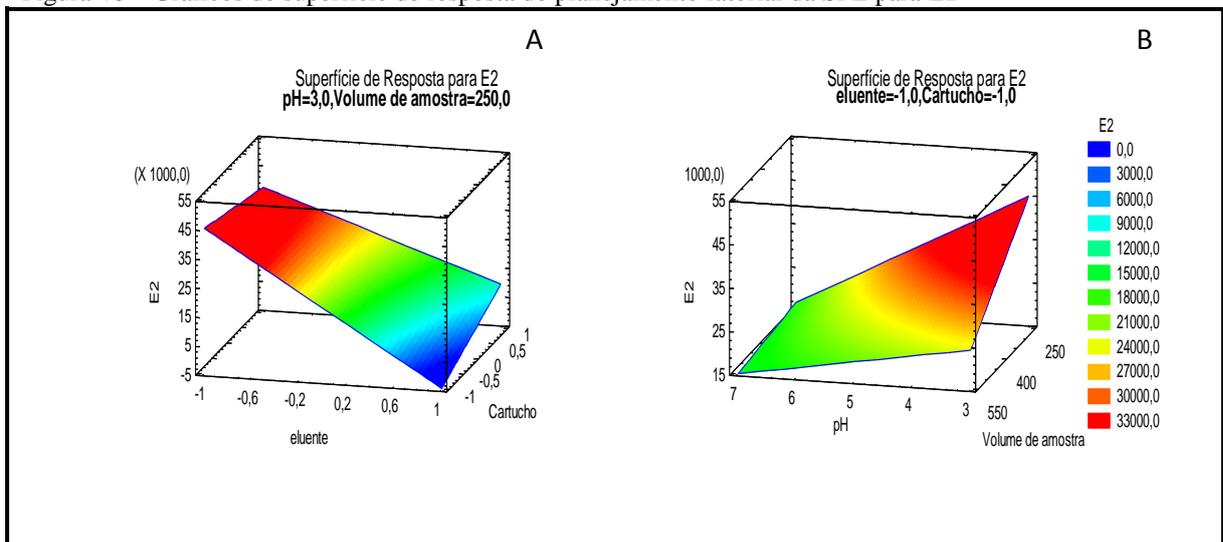
Para uma melhor visualização dos resultados obtidos para os parâmetros qualitativos (tipo de eluente e cartucho) são apresentados nas Figuras 45 a 49 os gráficos de superfície de resposta quando estes vão do nível -1 ao +1, os quais podem simplificar a interpretação dos resultados obtidos. Os valores dos parâmetros para os hormônios foram fixados nos seus respectivos valores ótimos.

Figura 45 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para E1



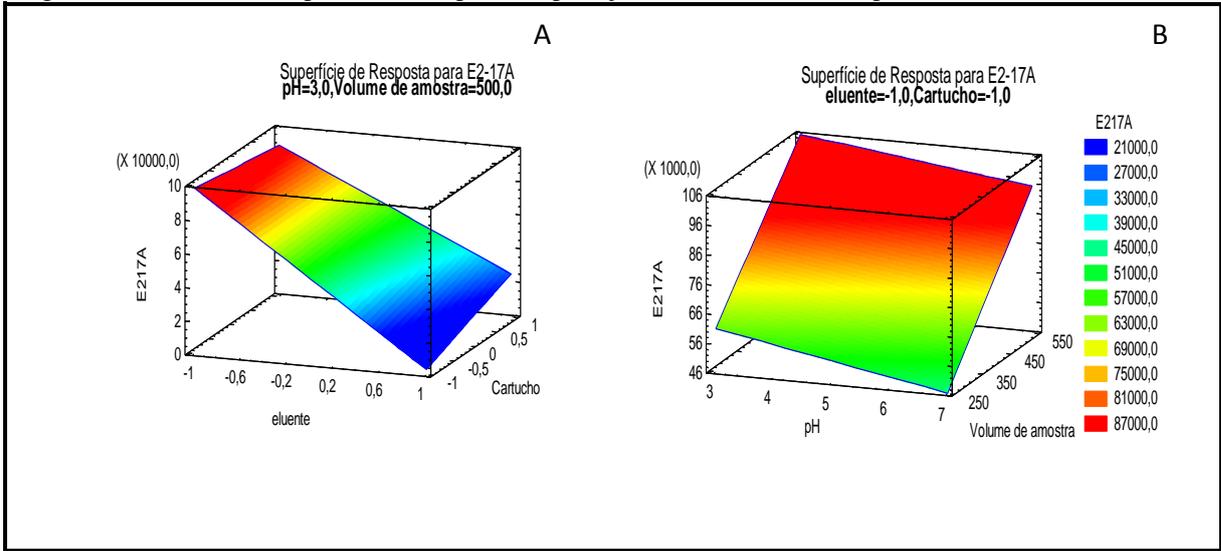
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 46 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para E2



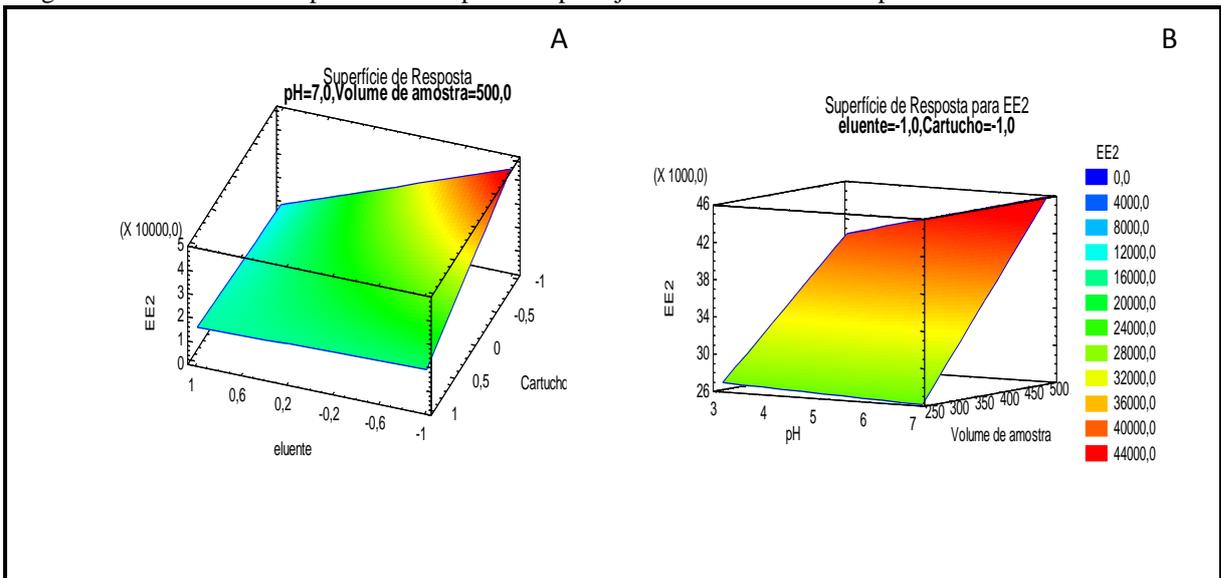
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 47 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para E2-17A



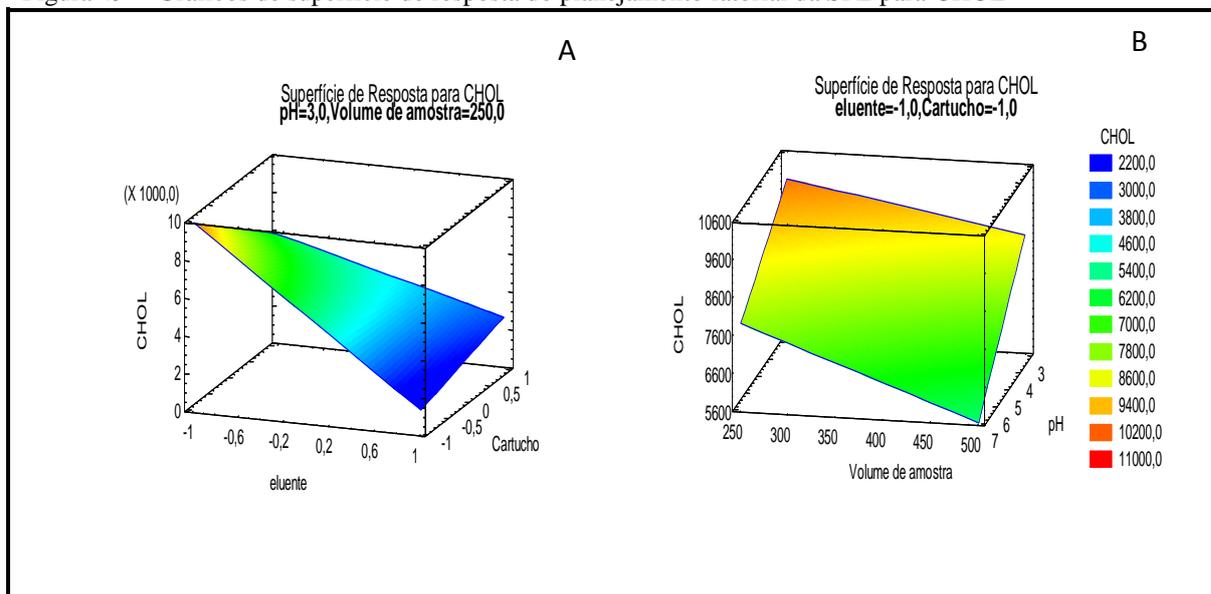
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 48 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para EE2



Fonte: AUTORA, 2012

Figura 49 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para CHOL



Fonte: AUTORA, 2012

Diante dos resultados obtidos para a superfície de resposta dos analitos E2 (Figura 46a), E2 – 17A (Figura 47a) e CHOL (Figura 49a) observa-se que o tipo de efluente é o fator preponderante na otimização da etapa de SPE. Portanto, MeOH apresenta uma maior capacidade de quebra das ligações π - π (ponte de Hidrogênio) formadas durante a interação do sorbente com o analito. Como os estrogênios apresentam semelhantes estruturas moleculares o mesmo eluente foi eficiente para romper suas ligações. Já para o E1 (Figura 45a) e EE2 (Figura 48a) o fator qualitativo de maior importância foi o tipo de cartucho utilizado, sendo o Oasis HLB® o que apresentou uma melhor resposta em termos de área do pico.

Pode-se observar que não há variação para as áreas obtidas quando há alteração do tipo de cartucho para E2 (Figura 46a), E2-17A (Figura 47a) e CHOL (Figura 49a), o que seria coerente, uma vez que o material dos cartuchos analisados (Oasis HLB e Strata-X) têm características semelhantes, ou seja, são polímeros hidrofóbicos. No entanto, quando mostrado os resultados de otimização (Tabela 25) o cartucho Oasis HLB® apresentou melhor resultado para todos os analitos, sendo, portanto, adotado durante a pesquisa. O mesmo cartucho vem sendo recomendado pela USEPA (2007), no método 1694.

Em termos de análise do pH, os gráficos mostram que o fator resposta dos estrogênios E1 (Figura 45b), E2-17A (Figura 47b) e EE2 (Figura 48b) não variou conforme a mudança de pH, concordando com os resultados obtidos por Pedrouzo *et al.* (2009), os quais não encontraram diferença significativa ao analisar os mesmos valores de pH aqui

apresentados (pH 3 e pH7). O E2 (Figura 46b) apresentou uma modificação significativa na superfície de resposta, em que o valor de área sofre um incremento quando o pH passa de 7 para 3, indicando que este último valor é mais recomendado para esse analito. Diferentemente do pH, o parâmetro de volume de amostra apresentou bastante significância para todos os estrogênios, conforme pode ser observada na forte variação nas cores da superfície (Figuras 45 a 49). Essa variação não ocorre na mesma intensidade para o composto CHOL (Figura 49).

Os valores de pH e volume de amostra dos analitos diferiram quanto aos resultados ótimos. Entretanto, como nenhum dos dois fatores apresentou interação significativa em termos de análise de variância (p -valor $> 0,05$), foram analisados os valores p . Aquele que mais se aproximou da significância (menor valor de p) foi o pH selecionado, sendo assim o pH 3 escolhido. O volume de amostra selecionado foi de 500 mL, baseado nas mesmas informações. De acordo com resultados obtidos por Bizkarguenaga *et al.* (2012), ao analisarem três volumes de amostras (100, 250 e 500 mL), as alíquotas de 500 mL apresentaram melhores respostas, além disso, nenhum efeito de volume de quebra (*breakthrough volume*) foi observado.

O efeito do pH na etapa de SPE foi avaliado por Huang *et al.* (2011), sendo que a matriz acidificada apresentava melhor resultado de recuperação, fato este confirmado pela presente pesquisa.

Tabela 25 – Resultados de otimização dos hormônios no planejamento fatorial da SPE

Composto	Eluente	Cartucho	pH	p -valor	Volume, mL	p -valor
E1	MeOH	Oasis HLB®	7	0,9627	500	0,1356
E2	MeOH	Oasis HLB®	3	0,8192	250	0,9688
E2-17A	MeOH	Oasis HLB®	3	0,7644	500	0,2498
EE2	MeOH	Oasis HLB®	7	0,6133	500	0,1719
CHOL	MeOH	Oasis HLB®	3	0,2993	250	0,9902

Fonte: AUTORA, 2012

5.3.5 Estudo da adição do modificador orgânico isopropanol

Na Tabela 26 são apresentados os resultados obtidos durante a análise do modificador de matriz isopropanol.

Tabela 26 – Eficiência de recuperação (%) para os hormônios com adição do Isopropanol (n=2)

Composto	Recuperação (%)	DP
E1	65,5	±0,48
E2	32	±0,46
E2-17A	128	±0,07
EE2	NA	NA
CHOL	4	±0,03

Fonte: AUTORA, 2012

NA: Não analisado

DP: Desvio Padrão

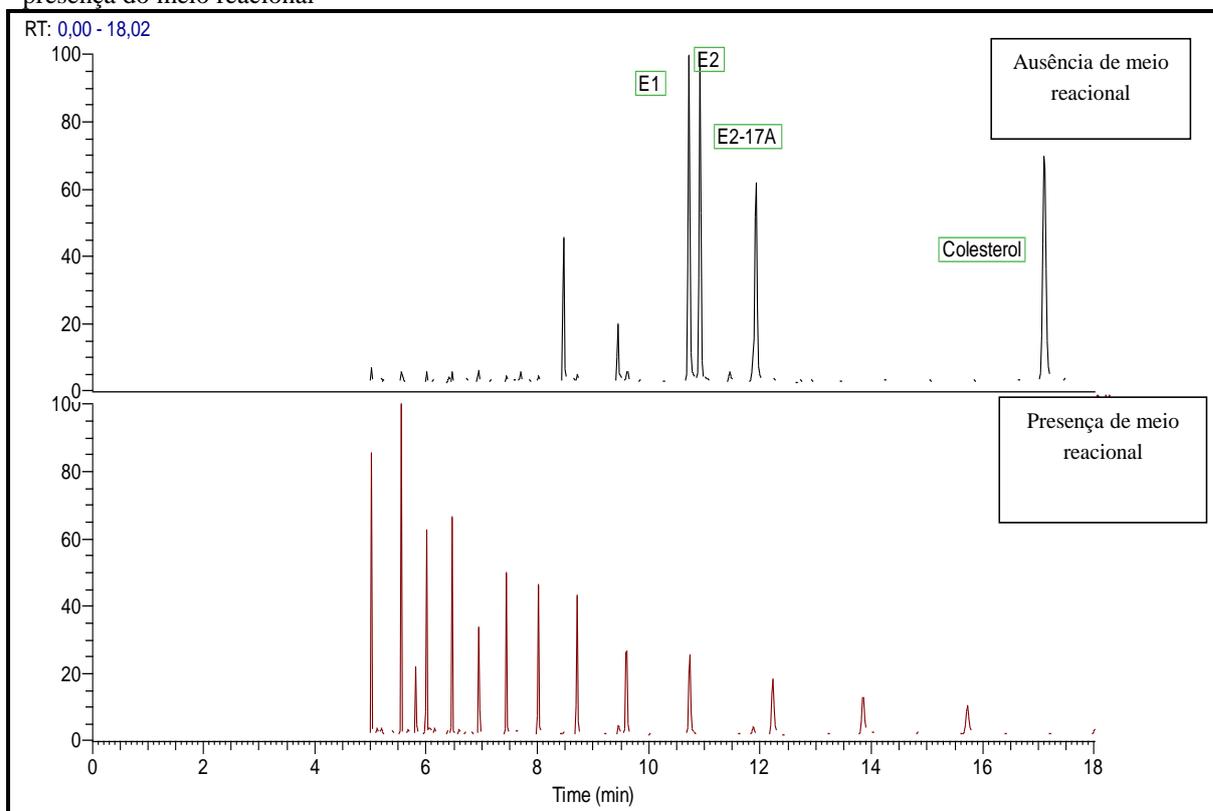
Os resultados obtidos de recuperação dos hormônios após adição do reagente isopropanol não apresentaram valores satisfatórios (Tabela 26), uma vez que para uma concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ nenhuma recuperação se situou dentro da faixa desejada de 80-110% (AOAC, 1998). Os resultados da presente pesquisa divergem dos encontrados por Jeanneau *et al.* (2007), os quais obtiveram uma melhor performance na recuperação quando adicionado isopropanol como modificador orgânico em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), com exceção de alguns compostos, dentre eles o naftaleno. A metodologia utilizada pelos autores apresentaram três fatores diferentes dos aplicados na presente pesquisa, a saber: adição de NaCl (2 g L^{-1}) à matriz; utilização de matriz sintética, ou seja, os ácidos húmicos eram adicionados à solução aquosa em concentrações conhecidas de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e acidificação a pH 1. Os fatores citados podem ter influenciado negativamente na eficiência verificada do presente estudo, muito embora os compostos analisados fossem diferentes daqueles estudados em Jeanneau *et al.* (2007).

O nosso resultado concorda com o reportado por Zhang *et al.* (2006), os quais não observaram aumento na eficiência de recuperação na etapa de SPE, atribuindo o fato à baixa concentração (10 g L^{-1}) analisada. Os autores utilizaram como agente surfactante o composto ácido dodecilbenzenosulfônico. Já Patrolecco *et al.* (2004) demonstraram que a utilização de um agente surfactante não iônico pode ser responsável pela solubilização de alguns DEs hidrofóbicos (*e.g.* NP e BPA).

5.4 Estudos de derivatização

Os resultados obtidos durante a análise do meio reacional são representados por meio dos cromatogramas da Figura 50.

Figura 50 – Cromatogramas de comparação das condições de derivatização dos hormônios na ausência e presença do meio reacional



Fonte:AUTORA, 2012

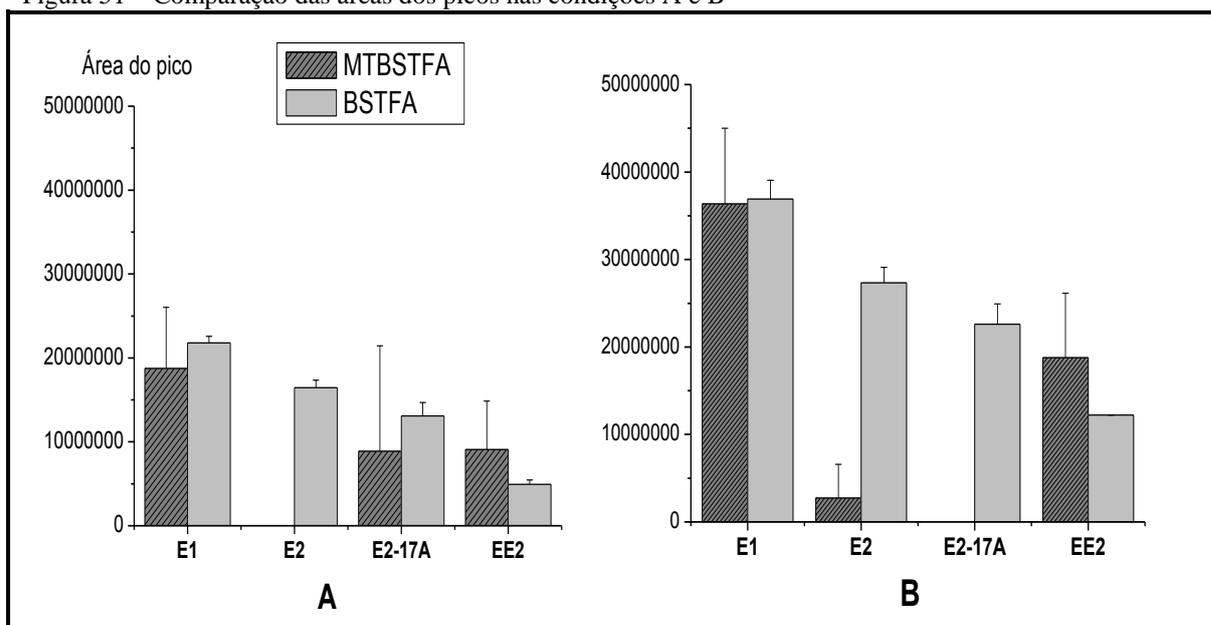
A partir dos resultados apresentados na Figura 50, pode-se observar que a presença do meio reacional para a realização da derivatização dos estrogênios prejudicou a reação. O resultado se dá possivelmente pela baixa solubilidade dos hormônios nos solventes utilizados no momento da sua redissolução ou devido à presença de água, a qual prejudica a etapa de derivatização (TERNES; JOSS, 2006). Uma outra possibilidade pode ser devido aos átomos de hidrogênios livres presentes nos solventes MeOH e EtOAC, os quais competiram com os hidrogênios dos estrogênios para reação com o grupo trimetilsilil TMS (ZHOU *et al.*, 2007; HALKET; ZAIKIN, 2003) uma vez que a reação de substituição ocorre no átomo de hidrogênio presente nas moléculas.

Shareef *et al.* (2004, 2006) demonstraram que solventes utilizados como meio reacional podem causar uma incompleta derivatização, assim como ocasionar a presença de picos múltiplos. Zuo e Zhang (2005) reportaram que uma derivatização completa e um derivatizado puro é formado quando o próprio agente derivatizante é utilizado na dissolução da amostra. Portanto, a metodologia adotada para a derivatização dos estrogênios deve ser

sem a redissolução dos mesmos em qualquer meio reacional, utilizando somente o próprio derivatizante durante a reação.

Os resultados da comparação das áreas dos picos obtidos durante a avaliação dos tipos de reagentes derivatizantes empregados na reação de derivatização nas condições distintas A e B são mostrados na Figura 51.

Figura 51 – Comparação das áreas dos picos nas condições A e B



Fonte: AUTORA, 2012

Legenda: A: 100µL; 75°C por 3 h; B: 50µL; 60°C por 30 min

Tabela 27 – Áreas médias e desvio padrão relativo obtidos na análise dos derivatizantes MTBSTFA e BSTFA

Composto	Condição A		Condição A	
	MTBSTFA ¹	DPR ² (%)	BSTFA	DPR
E1	18736673	38,87	21786443	3,62
E2	ND ³	ND	16447539	5,55
E2-17A	8888765	141,42	13092514	12,24
EE2	9095281,5	63,46	4922952	10,82
Composto	Condição B		Condição B	
	MTBSTFA ¹	DPR ² (%)	BSTFA	DPR
E1	36363696,5	23,77	36904992	5,87
E2	2724792	141,42	27340915	6,49
E2-17A	ND	ND	22606927	10,30
EE2	18773982,5	39,31	12214210	0,10

Fonte: AUTORA, 2012

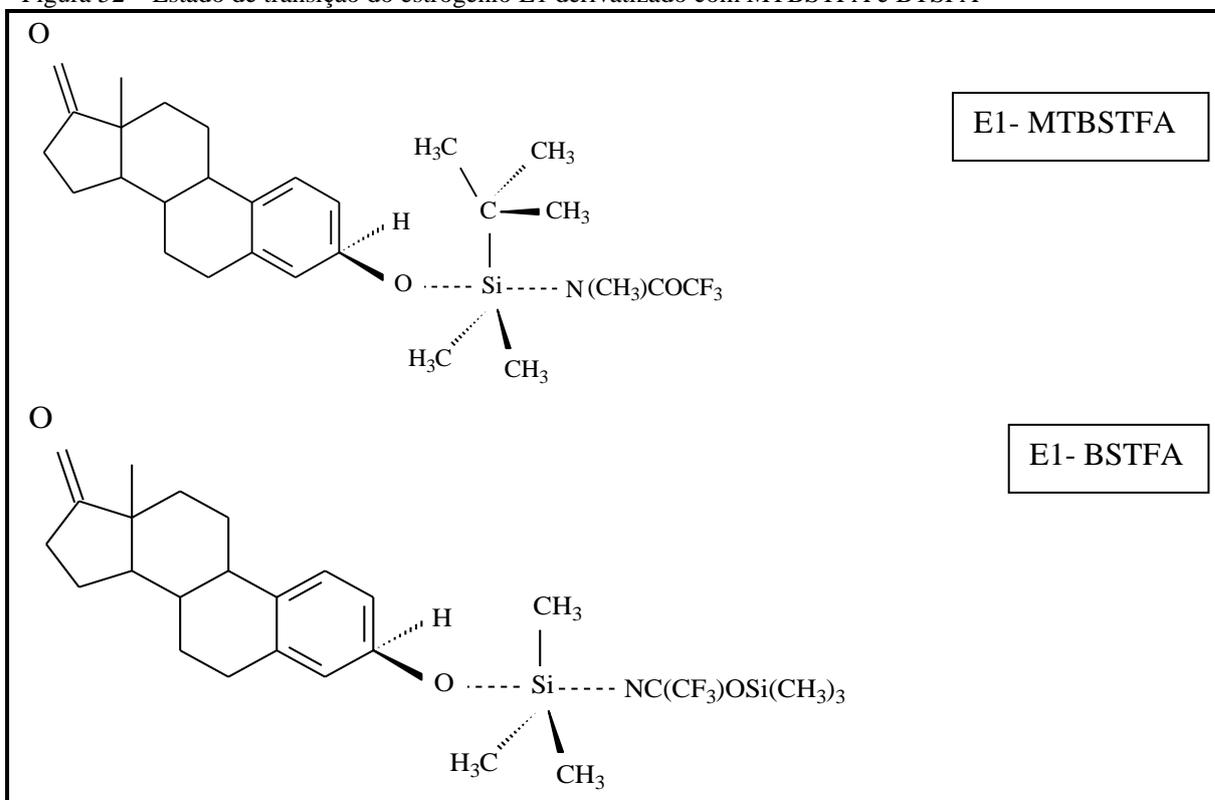
¹ Área média do pico; ² Desvio padrão relativo (em %); ³ Não detectado

Pode-se perceber que o derivatizante BSTFA apresentou, em geral, um melhor resultado em relação ao MTBSTFA, uma vez que o BSTFA obteve o produto derivatizado para todos os estrogênios analisados enquanto o MTBSTFA não derivatizou o E2 na condição A nem o E2-17A na condição B, conforme pode ser observado nas representações das áreas dos picos obtidas para cada composto. Portanto, nossos resultados estão de acordo com aqueles reportados em Quintana *et al.* (2004) no que concerne a insuficiente derivatização do MTBSTFA do E2 e a completa reação por BSTFA. Tal comportamento pode ser atribuído ao impedimento estérico ocasionado pelo MTBSTFA, pois sua estrutura molecular torna o reagente menos acessível à reação de derivatização quando comparado ao BSTFA, devido ao composto de transição formado durante a reação, ilustrado na Figura 52 (SCHUMMER *et al.*, 2009). Além disso o desvio padrão para o MTBSTFA foi maior que o obtido para o BSTFA (Tabela 27), indicando que o derivatizante BSTFA apresentava melhor reprodutibilidade na reação. Wu *et al.* (2008) reportaram que para esteróides fecais, dentre eles colesterol, o BSTFA apresentou melhor performance que o MTBSTFA.

A resposta obtida em termos de área é dependente da estrutura do composto analisado. Por exemplo, Magiera *et al.* (2011) realizaram experimento fatorial e concluíram que o melhor agente derivatizante era o MTBSTFA, sendo os compostos analisados por eles fármacos, β -bloqueadores, dentre outros.

Portanto, em termos de resposta analítica, o BSTFA foi o reagente selecionado, uma vez que os resultados das áreas obtidas apresentaram maiores valores quando comparados ao MTBSTFA. Pesquisadores como Hernando *et al.* (2004) selecionaram previamente aos seus estudos o BSTFA, devido à sua capacidade de reagir rapidamente com compostos orgânicos contendo grupo hidroxila, além da formação de compostos voláteis estáveis e boa solubilidade em solventes orgânicos.

Figura 52 – Estado de transição do estrogênio E1 derivatizado com MTBSTFA e BSTFA

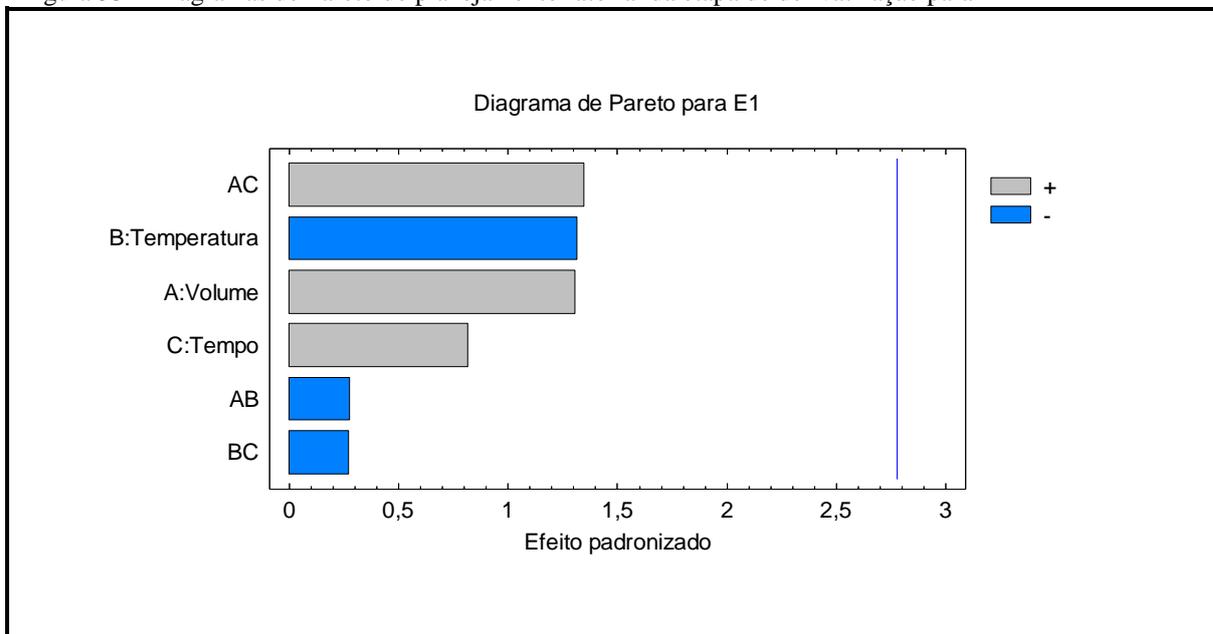


Fonte: Adaptado de SCHUMMER *et al.*, 2009

Após a seleção do tipo de derivatizante, foi realizada a otimização multivariada (2^3) das condições de reações. Os fatores analisados juntamente com as áreas dos picos cromatográficos como vetores resposta dos hormônios selecionados são apresentados na Tabela 28.

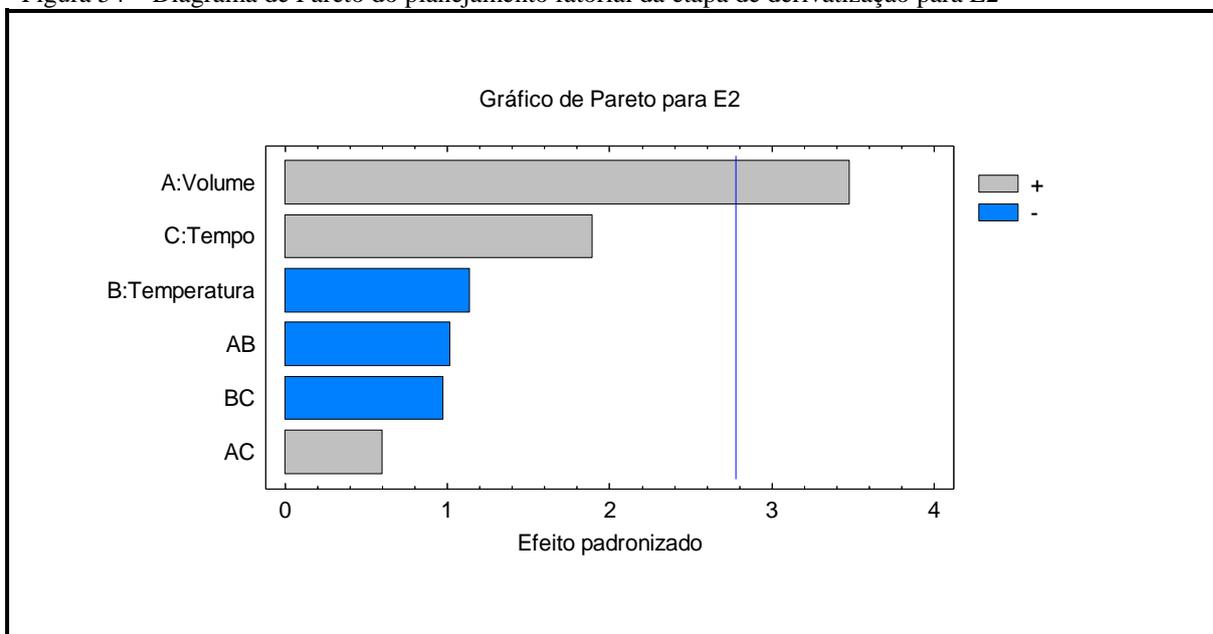
Com os resultados obtidos pelo *Statgraphics® Centurion XV* foram gerados os diagramas de Pareto para cada composto, com intervalo de confiança de 95%, os quais são mostrados nas Figuras 53 a 57. Na Tabela 28 é apresentada a matriz com seus fatores respostas em termos de área do pico. Por fim, os valores ótimos de volume, temperatura e tempo de reação para os hormônios selecionados são apresentados na Tabela 29.

Figura 53 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para E1



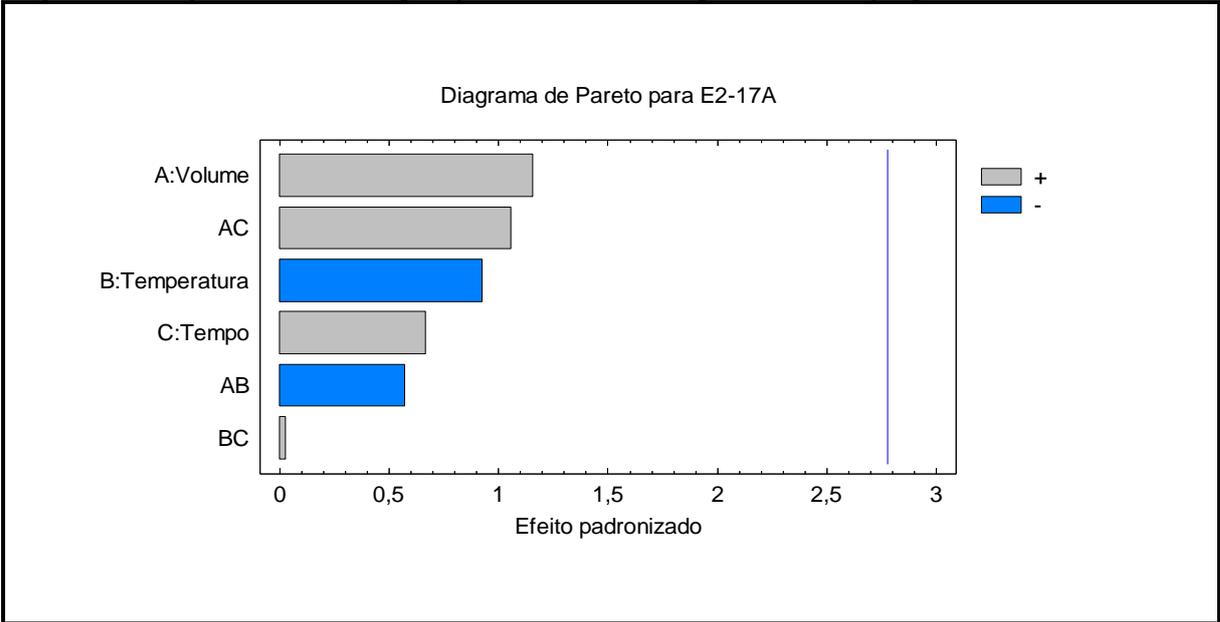
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 54 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para E2



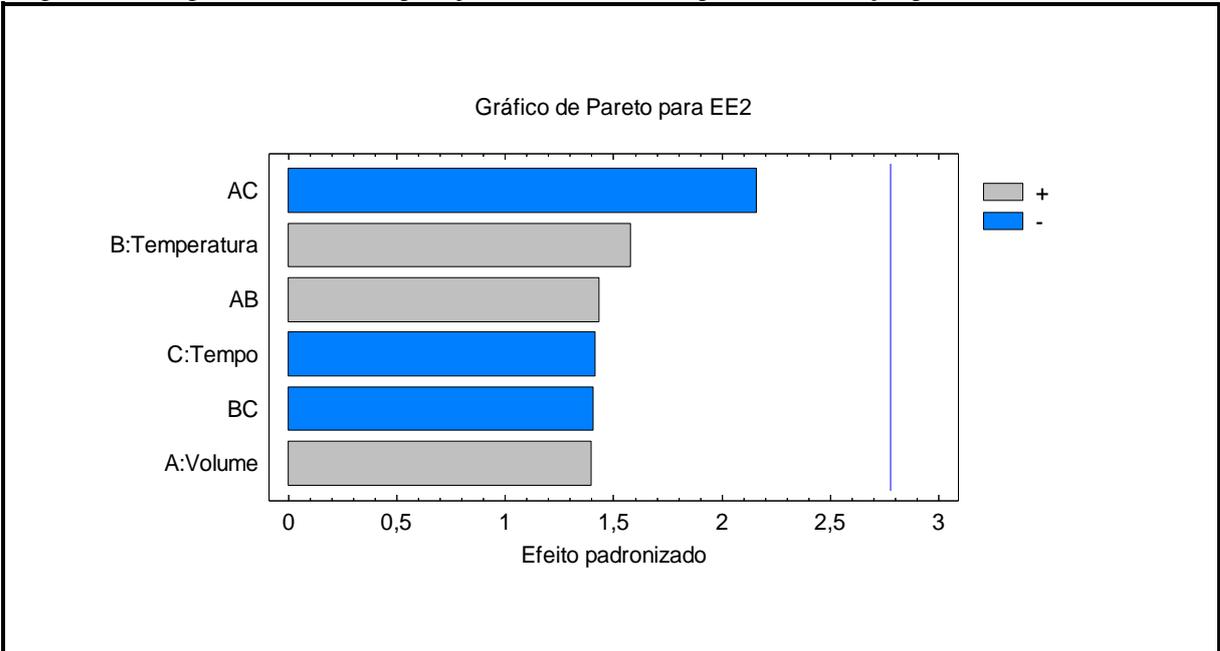
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 55 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para E2-17A



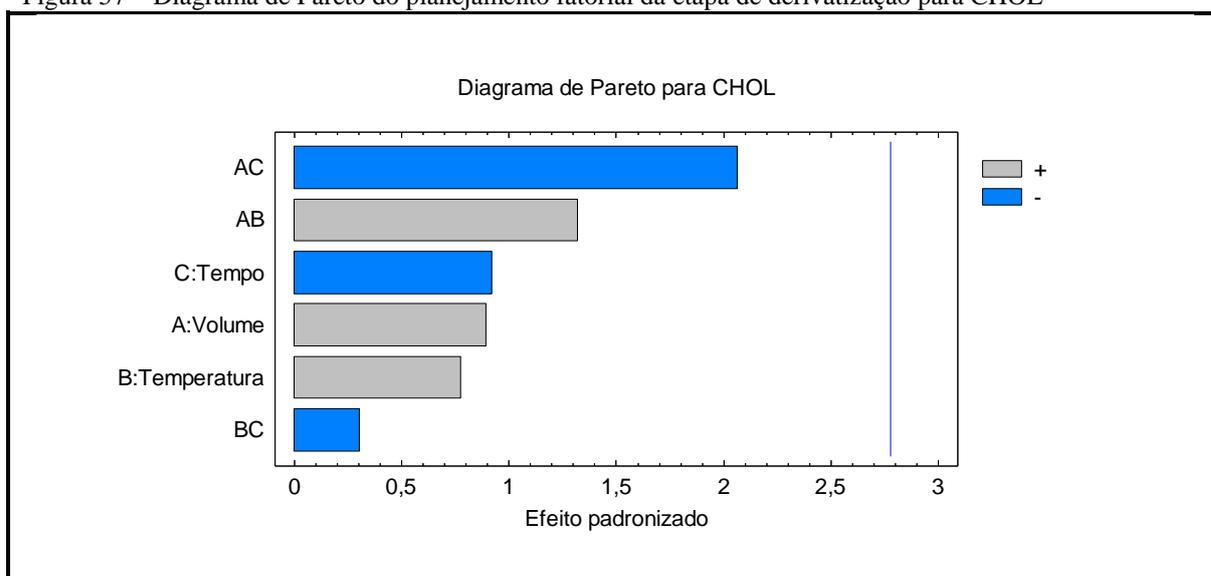
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 56 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para EE2



Fonte: AUTORA, 2012

Figura 57 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial da etapa de derivatização para CHOL



Fonte: AUTORA, 2012

Tabela 28 – Matriz para o planejamento fatorial (2^3) e áreas dos picos dos cromatogramas obtidos para a otimização das condições de derivatização dos hormônios utilizando BSTFA como reagente derivatizante

Ensaio	Volume (μL)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (minutos)	E1	E2	E2-17A	EE2	CHOL
1	50	60	30	215488	62209	158546	50499	14240395
2	75	40	15	382760	156467	287236	32892	23765770
3	25	80	45	328518	100410	271812	27684	22594862
4	75	40	45	653424	263231	440220	19319	17724750
5	25	80	15	306112	76308	230242	27737	18187361
6	25	40	45	345191	113645	228226	33101	23179059
7	75	80	15	365675	141147	265926	78372	32780968
8	50	60	30	376334	115490	284248	53741	22277406
9	50	60	30	383900	115774	279579	35351	22946766
10	25	40	15	448888	69574	312214	19715	20816150
11	75	80	45	426611	165258	299409	27787	21119576

Fonte: AUTORA, 2012

Tabela 29 – Valores de otimização obtidos no planejamento fatorial da etapa de derivatização

Composto	Volume (μL)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)
E1	75	40	45
E2	75	40	45
E2-17A	75	40	45
EE2	75	80	15
CHOL	75	80	15

Fonte: AUTORA, 2012

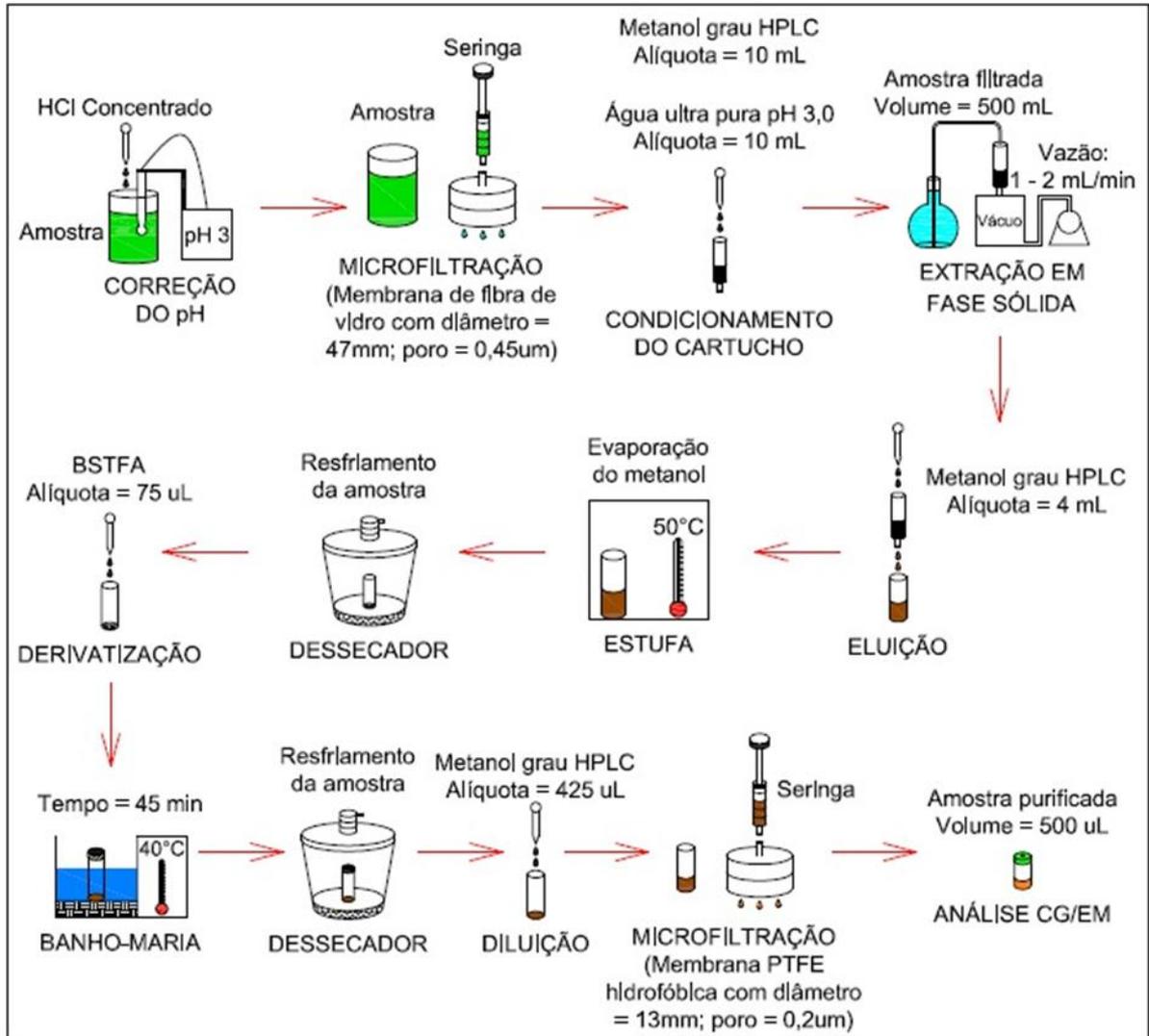
Os diagramas de Pareto apresentados mostram que à medida que é aumentado o volume de reagente derivatizante há um efeito positivo no fator resposta. Contudo, apenas para o composto E2 houve diferença significativa ($p < 0,05$), concordando com o resultado observado por Huang *et al.* (2009). Tais autores concluíram que quanto maior o volume de reagente utilizado mais grupos hidroxilas são derivatizados, no entanto o volume considerado satisfatório para a derivatização dos estrogênios foi de apenas 15 μL . Embora eles não tenham realizado o experimento fatorial, ou seja, não analisaram a interação entre os parâmetros, os valores otimizados para a reação foram: 15 μL , 20°C e 10 minutos, diferindo, portanto, dos encontrados na presente pesquisa.

De acordo com as Figuras 53 a 57 não foram observados outros efeitos significativos para os outros analitos avaliados. De acordo com os resultados de otimização mostrados na Tabela 29 as condições selecionadas para a realização da etapa de derivatização foram: 75 μL , 40°C e 45 minutos. A temperatura ótima para o composto EE2 (80°C) concordam com o reportado por Shareef *et al.* (2006), os quais fixaram a faixa de temperatura de 75-80°C.

Outras técnicas de derivatização devem ser analisadas, como a substituição do equipamento de banho-maria por bloco digestor, micro-ondas (BOWDEN *et al.*, 2009) ou banho ultrassônico (CASTRO *et al.*, 2011), com o objetivo de aperfeiçoar essa etapa crucial na detecção de desreguladores endócrinos.

A metodologia após a otimização das etapas de determinação dos DEs em matriz ambiental está apresentada na Figura 58.

Figura 58 - Metodologia utilizada para determinação de estrogênios



Fonte: AUTORA, 2012

5.5 Monitoramento dos desreguladores endócrinos (DEs) e do micropoluinte colesterol em esgotos sanitários de ETEs e em águas superficiais na Região Metropolitana de Fortaleza (RMF)

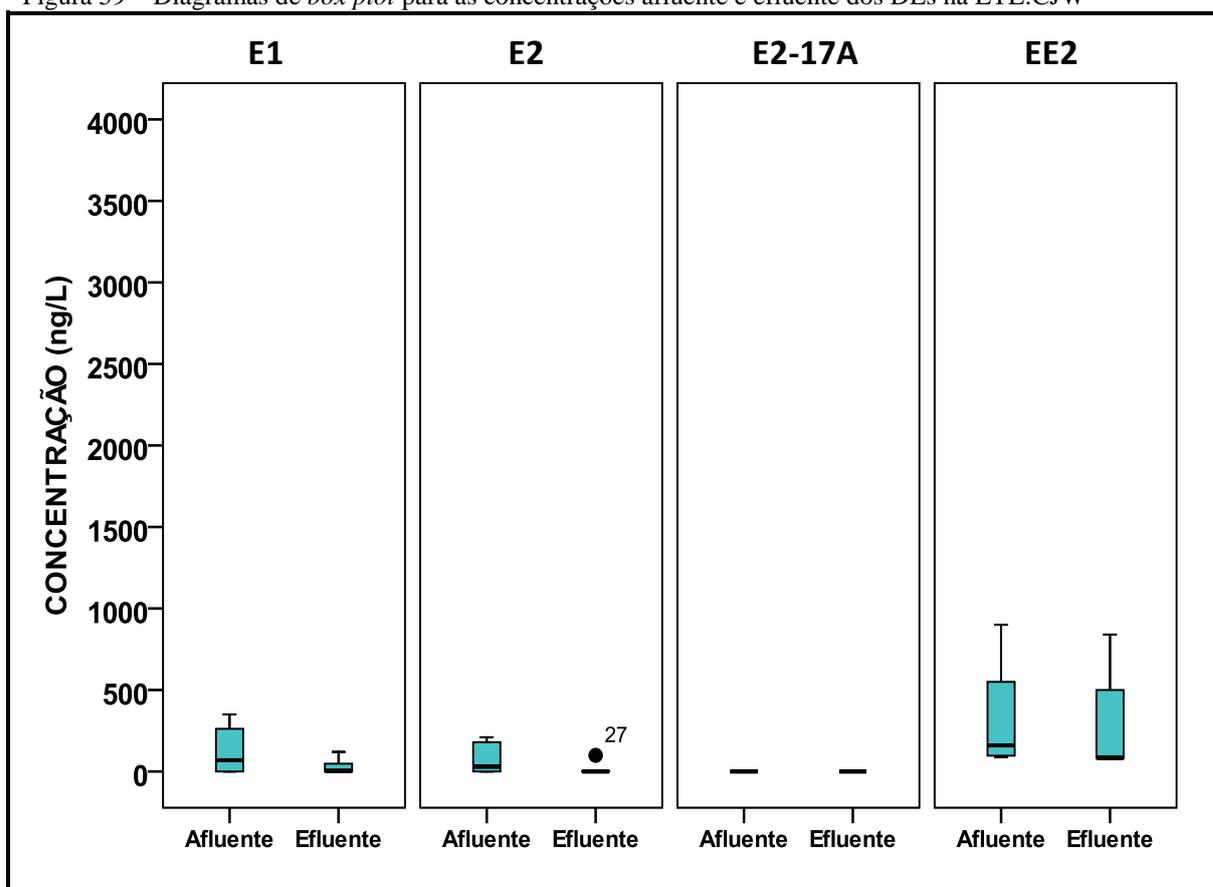
5.5.1 Monitoramento dos desreguladores endócrinos e do colesterol em esgotos sanitários

Os micropoluentes foram identificados e quantificados antes e depois do tratamento. Os cromatogramas obtidos juntamente com seu respectivo espectro de massa para cada composto na matriz ambiental de esgoto sanitário são apresentados no Apêndice B.

As amostras de esgoto afluente coletadas referem-se ao esgoto coletado após a passagem do tratamento preliminar, onde apenas os materiais mais grosseiros e areia eram removidos. Já a amostra de esgoto efluente refere-se ao esgoto coletado ao final de cada tratamento.

5.5.1.1 Estação de tratamento: Conjunto José Walter (CJW) – Lagoa Facultativa + Lagoa Maturação

As concentrações afluentes e efluentes dos micropoluentes emergentes na ETE: CJW são apresentadas nas Figuras 59 e 60.

Figura 59 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluente e efluente dos DEs na ETE:CJW

Fonte: AUTORA, 2012

A concentração máxima do DE estrona no afluente à ETE foi de 350 ng L^{-1} , portanto dentro da faixa de $20 - 617 \text{ ng L}^{-1}$ relatada em Leusch *et al.* (2006).

Diante dos resultados obtidos pode-se observar na Figura 59 que apenas os micropoluentes E1 e EE2 foram detectados no efluente final, após a lagoa de maturação, nas concentrações médias de $57,3 \text{ ng L}^{-1}$ e 317 ng L^{-1} , respectivamente. A frequência de detecção nas amostras de esgoto tratado foi de 60% para o E1 e de 100% para o EE2. A persistência do EE2 foi observada por Ternes *et al.* (1999b) durante um experimento realizado em batelada, em que a concentração do composto não sofria redução, se apresentando estável sob condições aeróbias.

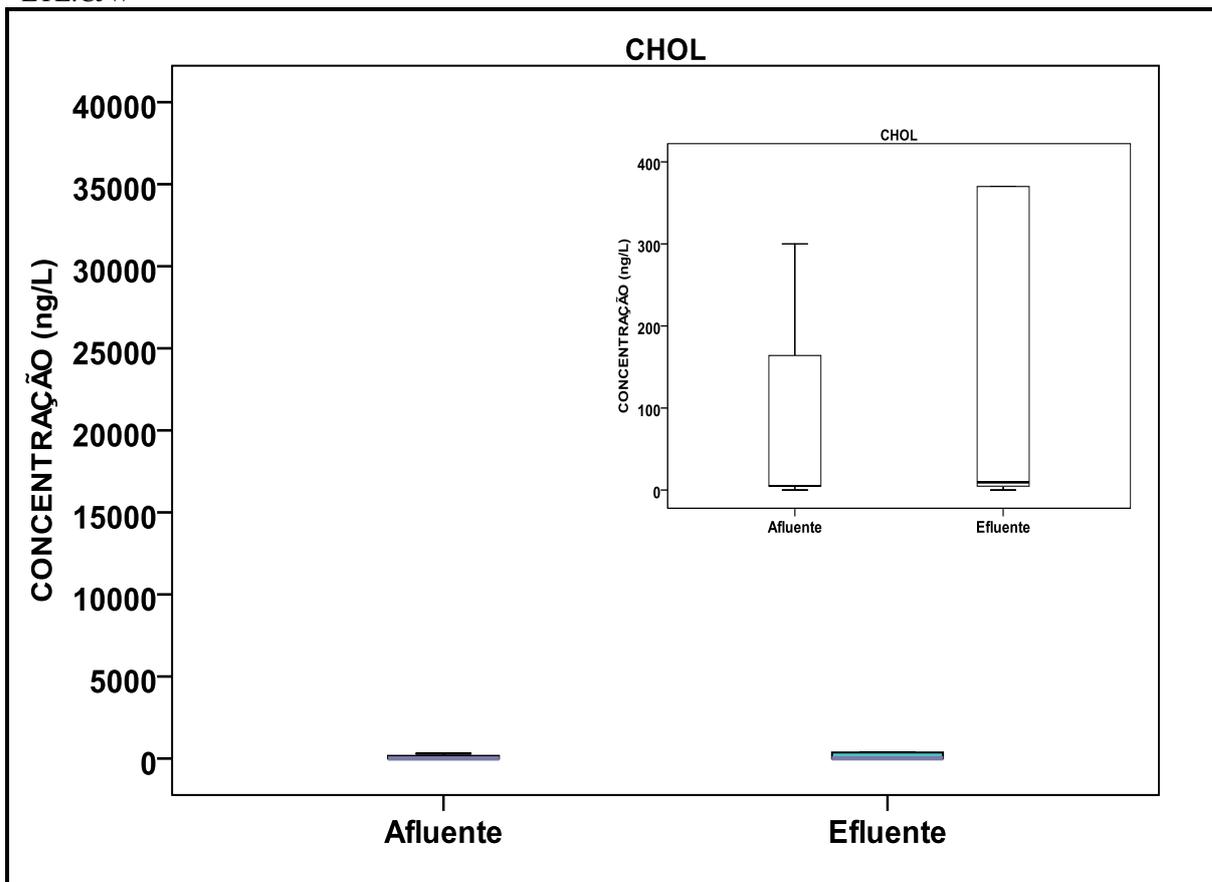
Os estrogênios E2 e E2-17A encontraram-se em concentrações abaixo do LD nos efluentes da ETE, exceto para uma concentração do E2 (*outlier* n°27). Pedrouzo *et al.* (2009) também não detectaram a presença do E2-17A em nenhuma das amostras de esgoto coletadas.

A remoção do E2 pode ser devido à bio-oxidação à E1 em ambientes aeróbios, diminuindo a taxa de remoção do estrogênio E1, fato já observado por alguns pesquisadores (ATKINSON *et al.*, 2012; PLÓSZ *et al.*, 2010; LEE; LIU, 2002)

Além da biodegradação, estudos indicam que fotodegradação dos compostos estrogênicos por radiação solar é uma provável rota de degradação em ambientes aquáticos como rios e mares (LIN; REINHARD, 2005; ZUO *et al.*, 2005). Leech *et al.* (2009) demonstraram que o composto E2 pode ser fotodegradado por radiações UV-A, UV-B e visível ($\lambda = 290-720$ nm) e que esta reação pode ser acelerada na presença de matéria orgânica, como as substâncias húmicas, provavelmente devido aos cromóforos presentes nessas substâncias, os quais produzem radicais livres como hidroxila ao absorverem energia solar. Segundo LIU e LIU (2004) a radiação também pode quebrar ligações do anel aromático presente nos estrogênios o que se torna favorável em lugares onde a radiação solar é intensa como o estado do Ceará. Segundo Duarte (2008) as lagoas de estabilização mostram resultados favoráveis de remoção, uma vez que estes compostos parecem ser sensíveis à fotodegradação. Análises das variáveis que influenciam a fotólise vêm sendo realizadas acreditando-se que a radiação solar direta tem um papel crucial na fotodegradação dos estrogênios em ambientes aquáticos (CHOWDHURY *et al.*, 2011; CHOWDHURY *et al.*, 2010).

Outra hipótese de mecanismo de remoção seria a acumulação dos estrogênios no lodo ou biomassa do sistema de tratamento, uma vez que esses compostos apresentam uma propriedade de hidrofobicidade classificada de moderada a alta ($\log K_{ow}$ 3-5) (DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2009). Nieto *et al.* (2008) analisaram amostras de lodo coletadas em duas estações de tratamento de esgoto doméstico na Espanha e detectaram a presença dos estrogênios E1, E2, E2-17A e EE2, nas concentrações respectivas de $< 200 \mu\text{g/kg}$; $< 250 \mu\text{g/kg}$; $< 375 \mu\text{g/kg}$ e $< 250 \mu\text{g/kg}$. Entretanto, outros estudos divergem quanto à sorção dos desreguladores endócrinos no lodo da ETE, destacando que a degradação biológica é a principal rota de remoção de desreguladores endócrinos em ETEs (ANDERSEN *et al.*, 2005 e MULLER *et al.*, 2008).

Figura 60 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:CJW



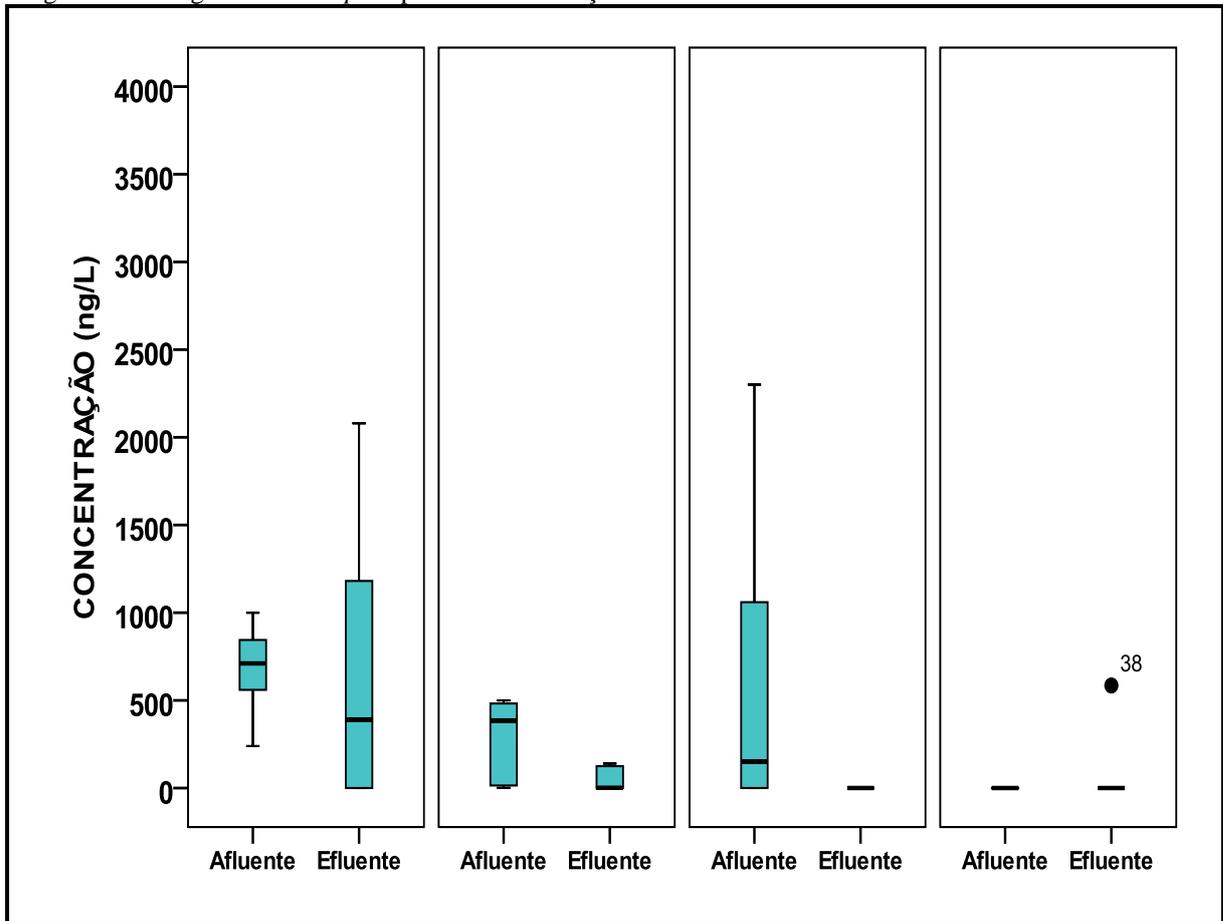
Fonte: AUTORA, 2012

Nos resultados obtidos do hormônio colesterol na ETE CJW observa-se que a concentração distribuída no efluente é maior do que a concentração afluente, atingindo um valor máximo de 370 ng L^{-1} . Esse resultado torna-se preocupante, uma vez que o colesterol foi incluído na lista de poluentes prioritários do estado de Oregon (USA), sendo considerado um composto tóxico e persistente ou bioacumulativo aos organismos aquáticos e/ou seres humanos (HOPE *et al.*, 2010). A ODEQ - *Oregon Department of Environmental Quality* (Departamento de Qualidade Ambiental de Oregon) estabeleceu o nível máximo de contaminação (*trigger levels*) em efluentes de sistema de tratamento de esgoto sanitário para alguns poluentes orgânicos persistentes (POPs), sendo a concentração máxima permitida para o colesterol de 3 ng L^{-1} (HOPE *et al.*, 2012). Portanto, a concentração obtida no efluente da ETE: CJW excede o nível estabelecido pela ODEQ, sendo necessárias pesquisas adicionais para esclarecer se esse composto apresenta um risco potencial a organismos aquáticos presentes nos corpos receptores (HOPE *et al.*, 2012).

5.5.1.2 Estação de tratamento: Tabapuá – Lagoa Facultativa + Lagoa Maturação

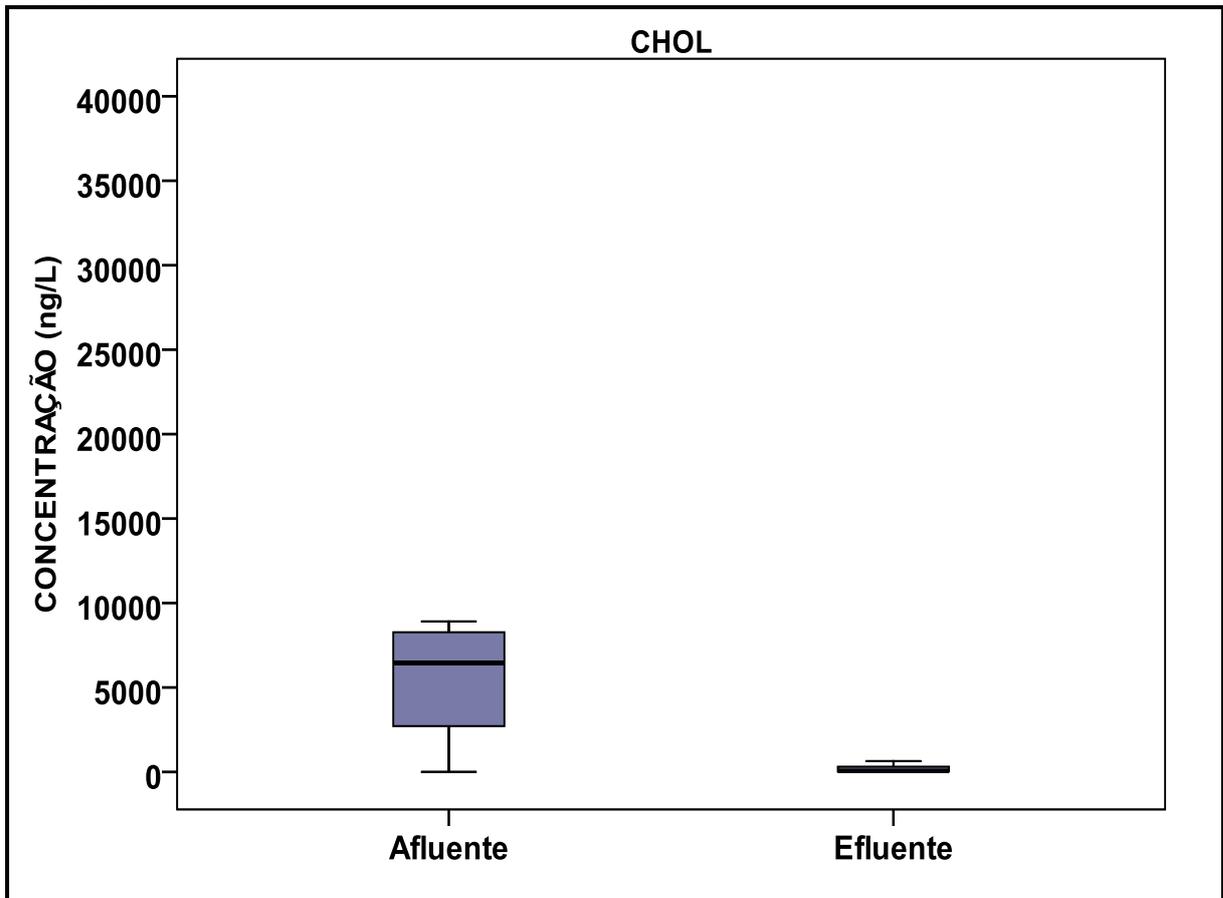
Nas Figuras 61 e 62 estão apresentados os perfis de concentrações dos DEs e colesterol obtidos para a ETE : TB. Já na Figura 63 é mostrado o perfil de remoção dos DEs ao longo do tratamento na ETE: TB, apenas na última amostragem realizada.

Figura 61 – Diagramas de *boxplot* para as concentrações afluente e efluente dos Des na ETE: TB



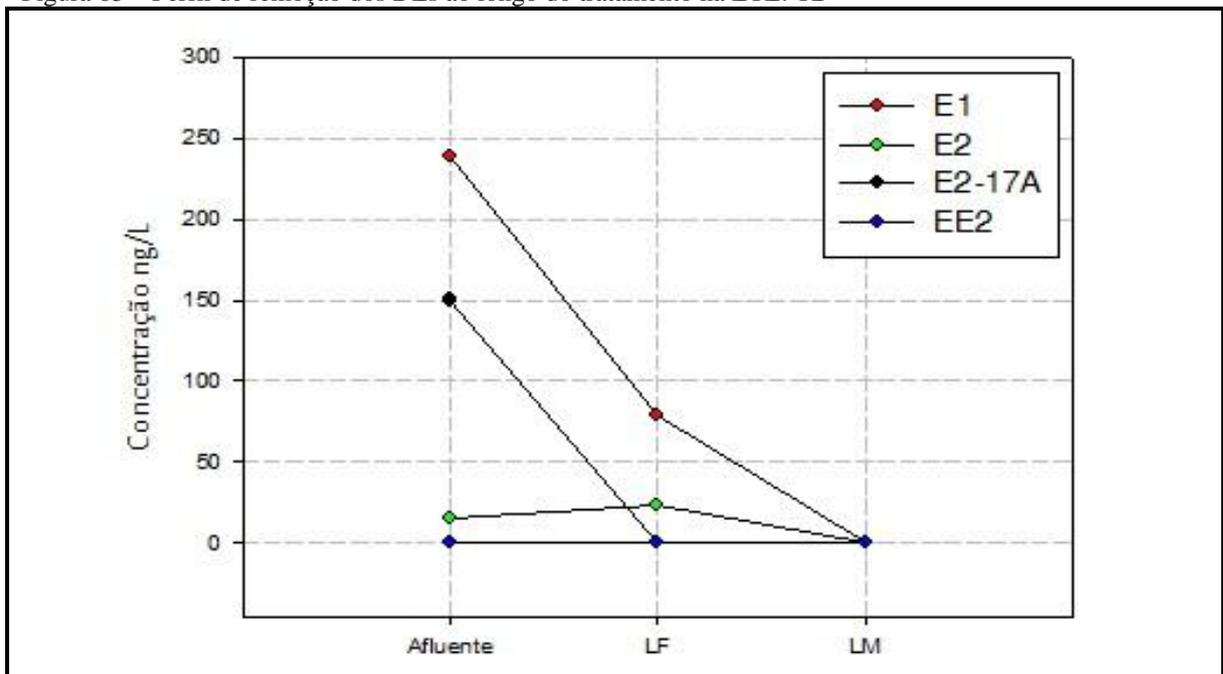
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 62 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:TB



Fonte: AUTORA, 2012

Figura 63 – Perfil de remoção dos DEs ao longo do tratamento na ETE: TB



Fonte: AUTORA, 2012

Legenda: LF: Lagoa Facultativa; LM: Lagoa de Maturação

Na Figura 61 observa-se que a concentração efluente do E1 é maior que a do afluente. Carballa *et al.* (2004) atribuíram o aumento do nível de E1 à oxidação mediada por micro-organismos, considerando como principal transformação em ETEs a oxidação de E2 e EE2 para E1. Os autores Fernandez *et al.* (2007) reportaram o aumento nas concentrações dos compostos E1 e E2 à medida que os mesmos atravessavam as etapas de tratamento biológico de lagoas de estabilização aeradas.

Em sistemas aeróbios, como o de lagoas de estabilização, é esperado um maior grau de desconjugação (o que também pode justificar a elevada concentração de E1) devido ao elevado tempo de contato entre o consórcio microbiano e o estrogênio, uma vez que esse tipo de tecnologia apresenta longos TDH (LISHMAN *et al.*, 2006). Especificamente para a ETE avaliada o TDH era de, aproximadamente, 18 dias. Existem relatos de o processo de desconjugação ter sido mediado pela ação da enzima β -glucuronidase produzida pela bactéria *Escherichia coli*, assim como o processo de oxidação (D'ASCENZO *et al.*, 2003; TERNES *et al.*, 1999b; LEE; LIU, 2002). Os compostos E2 e E2-17A sofreram remoções consideráveis, sendo a concentração média final obtida de 53 ng L⁻¹ e < LD, respectivamente. De acordo com o perfil obtido durante a última coleta na ETE (Figura 63) as maiores degradações de estrogênios ocorriam na lagoa facultativa, possivelmente pela combinação de vários fatores como biodegradação, sorção e mesmo fotólise. Baseado nos resultados obtidos de aumento de concentração de E1 entende-se que ocorreu uma bio-transformação do E2. No entanto, não pode ser afirmado que houve formação de E2-17A, não sendo descartada a hipótese da adsorção no sedimento da lagoa.

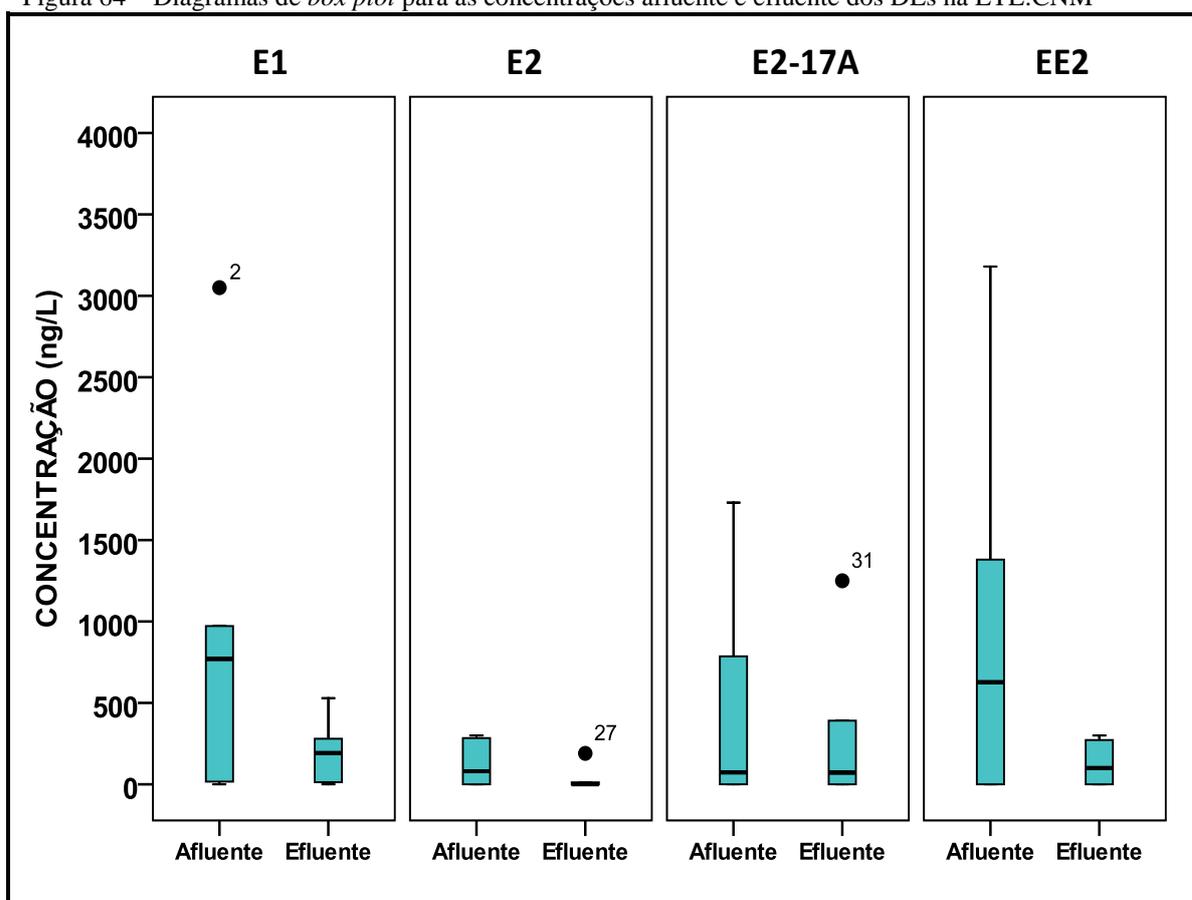
O EE2 não foi detectado no afluente e apenas uma vez no efluente, na concentração de 585 ng L⁻¹, o resultado obtido é semelhante ao estudo realizado por Atkinson *et al.* (2012), os quais detectaram uma concentração maior no efluente final. No entanto, os autores não discutiram ou apresentam hipóteses para tal comportamento.

No efluente final a concentração média para o colesterol foi de 209 ng L⁻¹, a qual foi ligeiramente menor do que a relatada por Beck *et al.* (2006) de 30-180 μ g L⁻¹.

5.5.1.3 Estação de tratamento: Conjunto Nova Metr pole (CNM) – Lagoa Facultativa

Nas Figuras 64 e 65 s o apresentados os diagramas de *box plot* das concentra es afluentes e efluentes dos DEs e do micropoluinte colesterol na ETE : CNM.

Figura 64 – Diagramas de *box plot* para as concentra es afluente e efluente dos DEs na ETE:CNM



Fonte: AUTORA, 2012

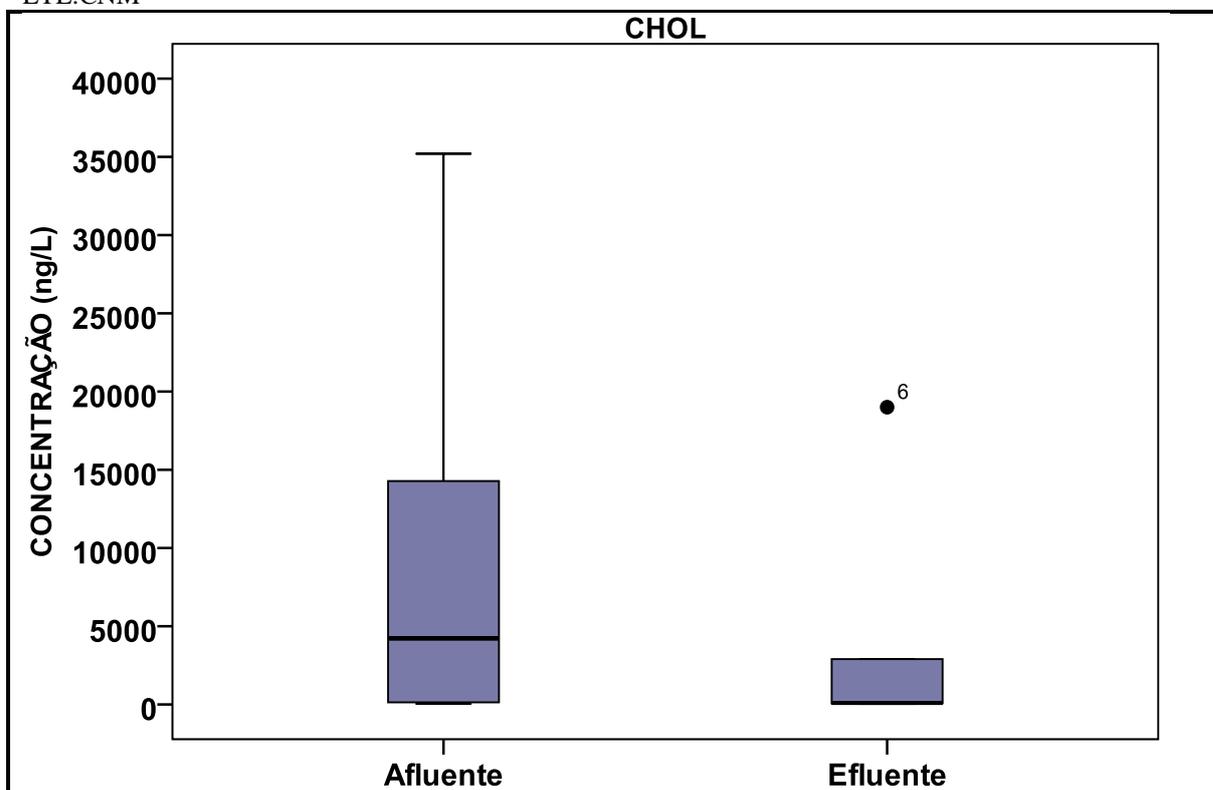
A concentra o afluente do E1 variou de 3050 ng L⁻¹ (*outlier* n 2) a < LD, e o E2 variou de 300 a < LD. Os valores encontrados situam-se acima dos obtidos por Lishman *et al.* (2006) na avalia o de 12 ETEs, das quais 3 eram lagoas facultativas. Tais autores detectaram os horm nios E2 e E1 antes do tratamento nas faixas de concentra es de 6 a 14 ng L⁻¹ e 16 a 49 ng L⁻¹, respectivamente. O conceito de dilui o dos DEs   um fator importante a ser considerado, a qual depender  do uso de  gua nos usos dom sticos,  gua de infiltra o, hor rio de coleta e etc. Assim, suas concentra es podem variar, conforme demonstrado no *outlier* representado pelo n 2 na Figura 64. Al m disso, a concentra o

excretada de estrogênios naturais e sintéticos varia de pessoa a pessoa, sendo influenciada por vários fatores como: sexo, idade, estado de gestação, ciclo menstrual, quantidade administrada. Estes fatores induzem flutuações nas concentrações afluentes de estrogênios nas ETEs (VERLICHI *et al.*, 2010; KVANLI *et al.*, 2008).

Alguns autores atribuem a variação de concentração dos micropoluentes às mudanças sazonais (VIENO *et al.*, 2005). As concentrações afluentes para os estrogênios na ETE analisada variaram de 17 - 3050 ng L⁻¹, valores menores do que os obtidos por Ghiselli (2006), 4830 - 6690 ng L⁻¹, no estado de São Paulo.

Para o *outlier* obtido correspondente ao n° 27, concentração no efluente final de 190 ng L⁻¹, sendo que a concentração do E2 afluente nesse ponto de coleta encontrou-se menor que o LD (vide Apêndice C). Uma hipótese é a de que o E2 foi lançado na ETE na sua forma conjugada (que não foi detectada durante a pesquisa) e, posteriormente, passou pelo processo de desconjugação mediada por processos microbiológicos, voltando então para a sua forma livre (detectada) e, portanto, a sua concentração efluente obtida foi maior que a afluente. Esse resultado foi observado por autores como D'Ascenzo *et al.* (2003) e Kvanli *et al.* (2008), tendo estes confirmado o processo de desconjugação do E2 através de ensaios laboratoriais de biodegradação.

Figura 65 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:CNM



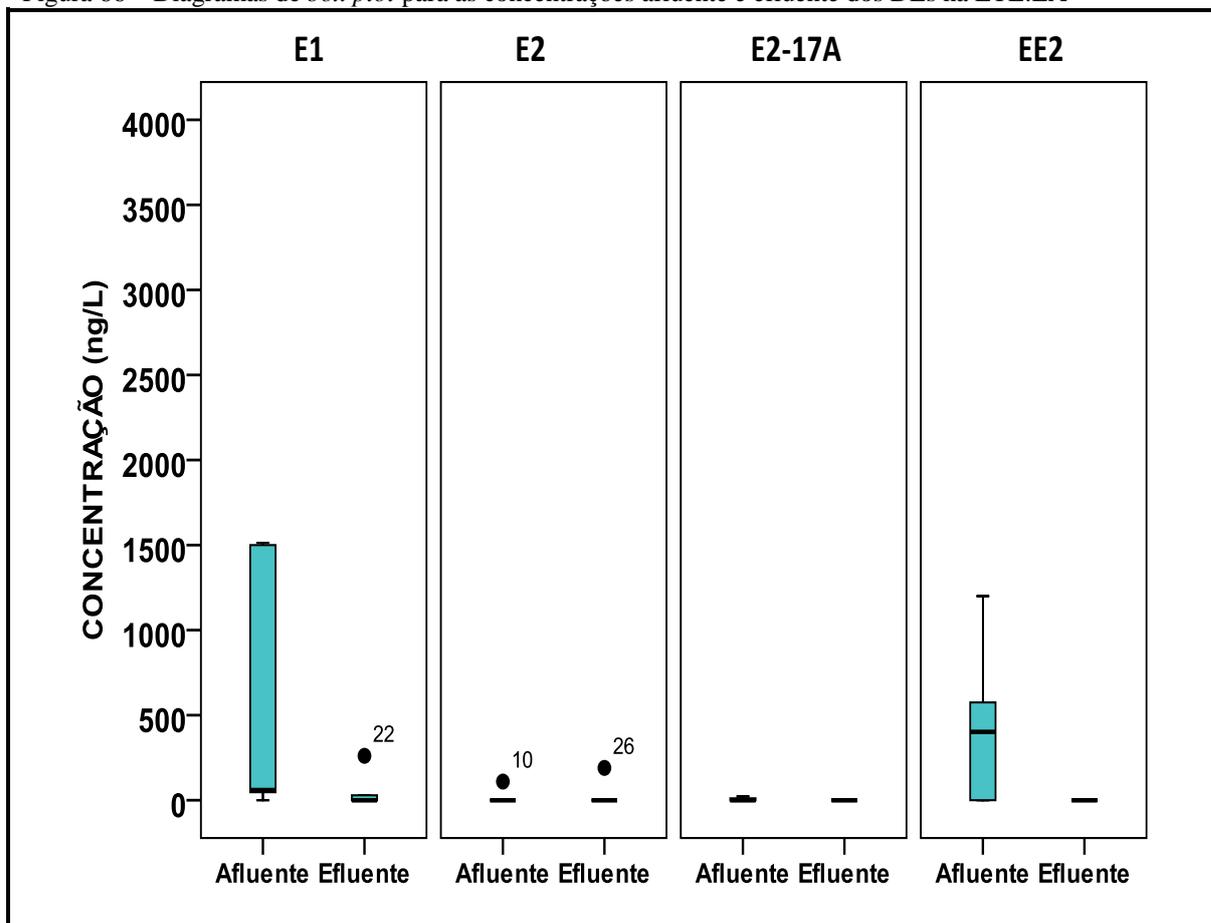
Fonte: AUTORA, 2012

Os elevados valores de concentração obtidos para o colesterol afluente (média= 10776 ng L⁻¹) são menores aos encontrados por Beck e Radke (2006), os quais obtiveram como valor médio 91000 ng L⁻¹ do esteroide em afluente doméstico, apenas após passar por um tanque de sedimentação aerado. A média da concentração para o efluente final foi de 1221 ng L⁻¹. Já os valores reportados por Huang *et al.* (2010) em efluentes excedem os encontrados durante a presente pesquisa, chegando a valores de 59.320 ng L⁻¹.

Devido à excreção do colesterol ser maior do que os estrogênios, sua concentração encontrada em efluentes domésticos é equivalente. Andrási *et al.* (2011) encontraram uma concentração de até 41000 ng L⁻¹ no afluente e 2880 ng L⁻¹ no efluente proveniente de ETEs localizadas na Hungria, valores bastantes semelhantes aos obtidos durante a avaliação da ETE:CNM, 35200 ng L⁻¹ para afluente e 3000 ng L⁻¹ efluente (valores máximos). A redução da concentração do CHOL pode não ter ocorrido devido apenas à biodegradação, segundo dados publicados pela USEPA (2009) o esteroide colesterol pode ainda encontrar-se adsorvido à biomassa de ETEs na concentração média de 1129 µg kg⁻¹ dw (*dry weight* – massa seca).

5.5.1.4 Estação de tratamento: Itaperussu – Lodos Ativados (LA)

Nas Figuras 66 e 67 são apresentados os resultados obtidos das concentrações afluentes e efluentes à ETE de lodos ativados seguido da etapa de cloração dos micropoluentes emergentes.

Figura 66 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluente e efluente dos DEs na ETE:LA

Fonte: AUTORA, 2012

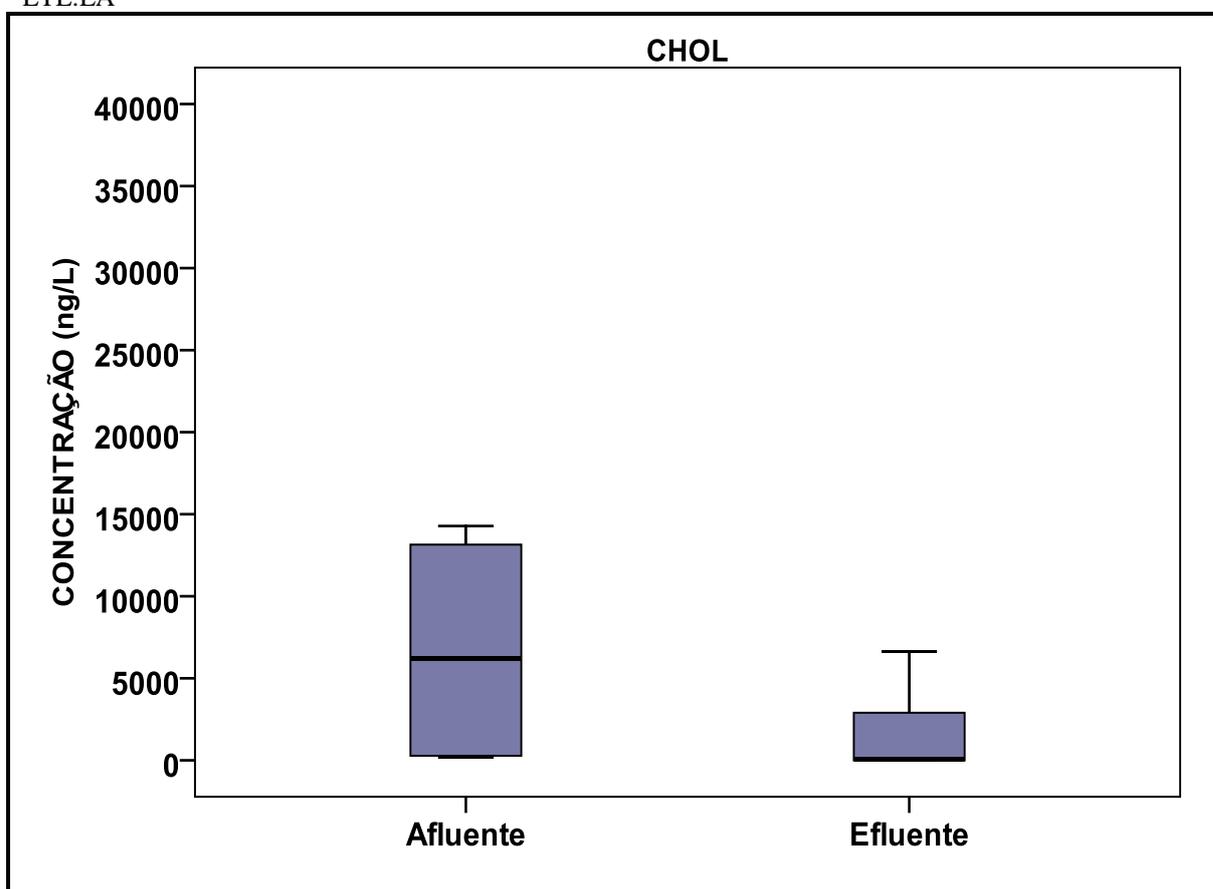
Os estrogênios não foram detectados no efluente doméstico analisado, exceto para os pontos *outliers* de nº22 (E1 – 261 ng L⁻¹) e nº26 (E2 – 190 ng L⁻¹). O valor máximo obtido para no efluente proveniente do tratamento por lodos ativados E1 concorda com o obtido por Atkison *et al.* (2012), os quais reportaram uma concentração máxima de 350 ng L⁻¹, no efluente de uma ETE utilizando tecnologia de lodos ativados seguido de eventual cloração. Semelhantemente, Williams *et al.* (2007) detectaram apenas o estrogênio E1, na concentração de 5,76 ng L⁻¹, não sendo encontrado E2 e EE2 após passar pelo sistema de LA seguido de cloração.

O EE2 esteve presente após o tratamento, mas em concentração abaixo do limite de quantificação, não sendo possível o cálculo de sua remoção. Devido à sua persistência, conforme relatada por de Mes *et al.* (2008), o EE2 pode ter sido biodegradado ou ainda ter sido adsorvido no lodo, uma vez que seu coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é maior que os dos compostos E1 e E2, ou seja, sua tendência a ser adsorvido no lodo da ETE é

particularmente maior (SUIDAN *et al.*, 2005; LAI *et al.*, 2002). Por outro lado, Yi *et al.* (2006) relataram que a biodegradação é mais representativa do que a sorção do EE2 à biomassa de biorreatores.

A remoção do EE2 ainda é bastante discutida, existindo pesquisas divergentes, não podendo se chegar a uma confirmação de degradação, ou mesmo biosorção, principalmente em uma ETE em escala real onde existe uma diversidade de parâmetros não controlados que influenciam direta ou indiretamente nos resultados de eficiência de remoção, tais como, concentração de EE2 afluente, consórcio microbiano envolvido na degradação, temperatura, concentração de amônia afluente, dentre outros (YI *et al.*, 2006).

Figura 67 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluente e efluente do micropoluente colesterol na ETE:LA



Fonte: AUTORA, 2012

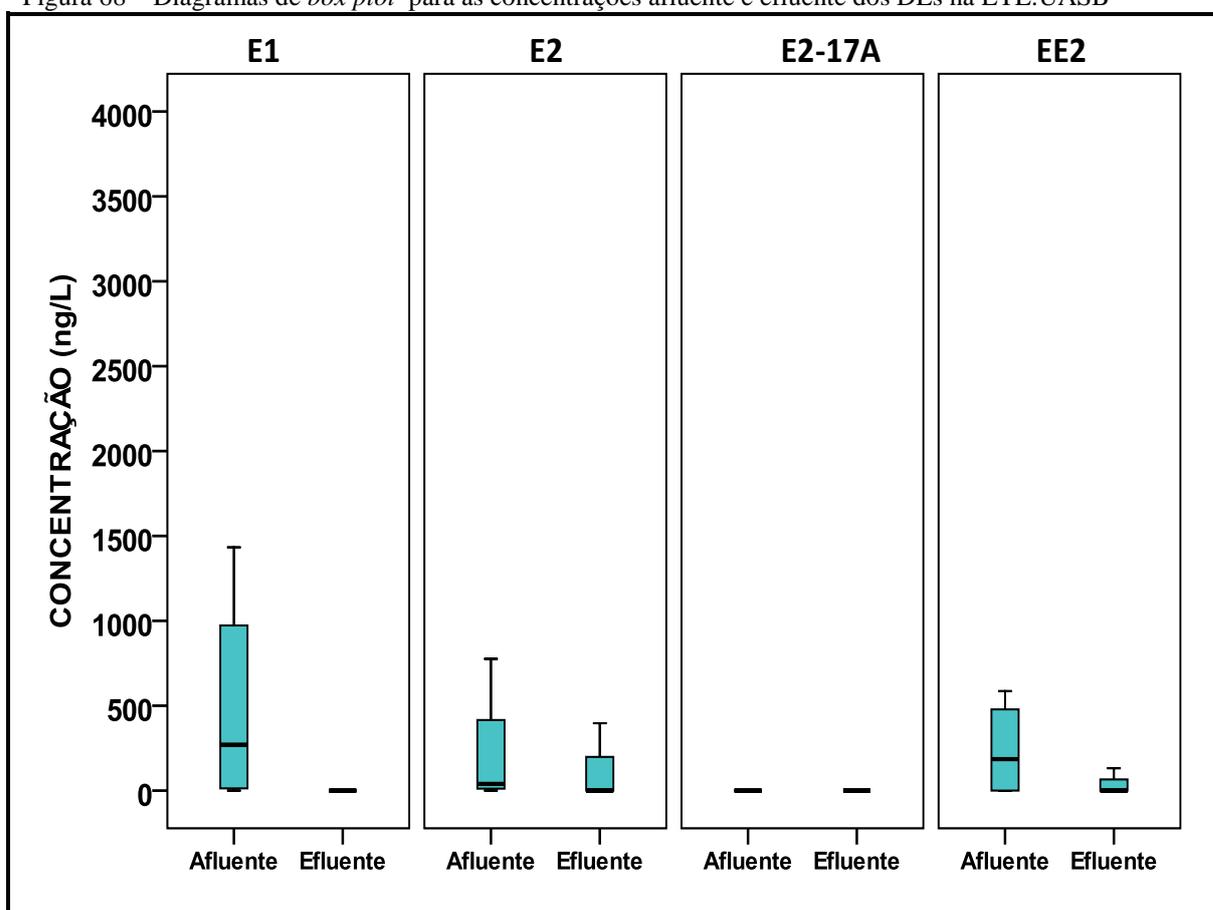
Analisando a ETE: LA em termos de concentrações afluentes e efluentes do composto colesterol, pode-se observar que a concentração afluente variou de 157 a aproximadamente 15000 ng L^{-1} , e a efluente de $< \text{LD}$ a 630 ng L^{-1} . Os resultados obtidos corroboraram com os de Sahar *et al.* (2011), os quais reportaram a concentração máxima de

53,433 ng L⁻¹ para colesterol no esgoto bruto e de aproximadamente 500 ng L⁻¹ para o efluente final, após tratamento em sistema de lodos ativados.

5.5.1.5 Estação de tratamento: Itaperussu – UASB

Os resultados obtidos durante a análise dos micropoluentes no reator UASB são apresentadas nas Figuras 68 e 69.

Figura 68 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluente e efluente dos DEs na ETE:UASB



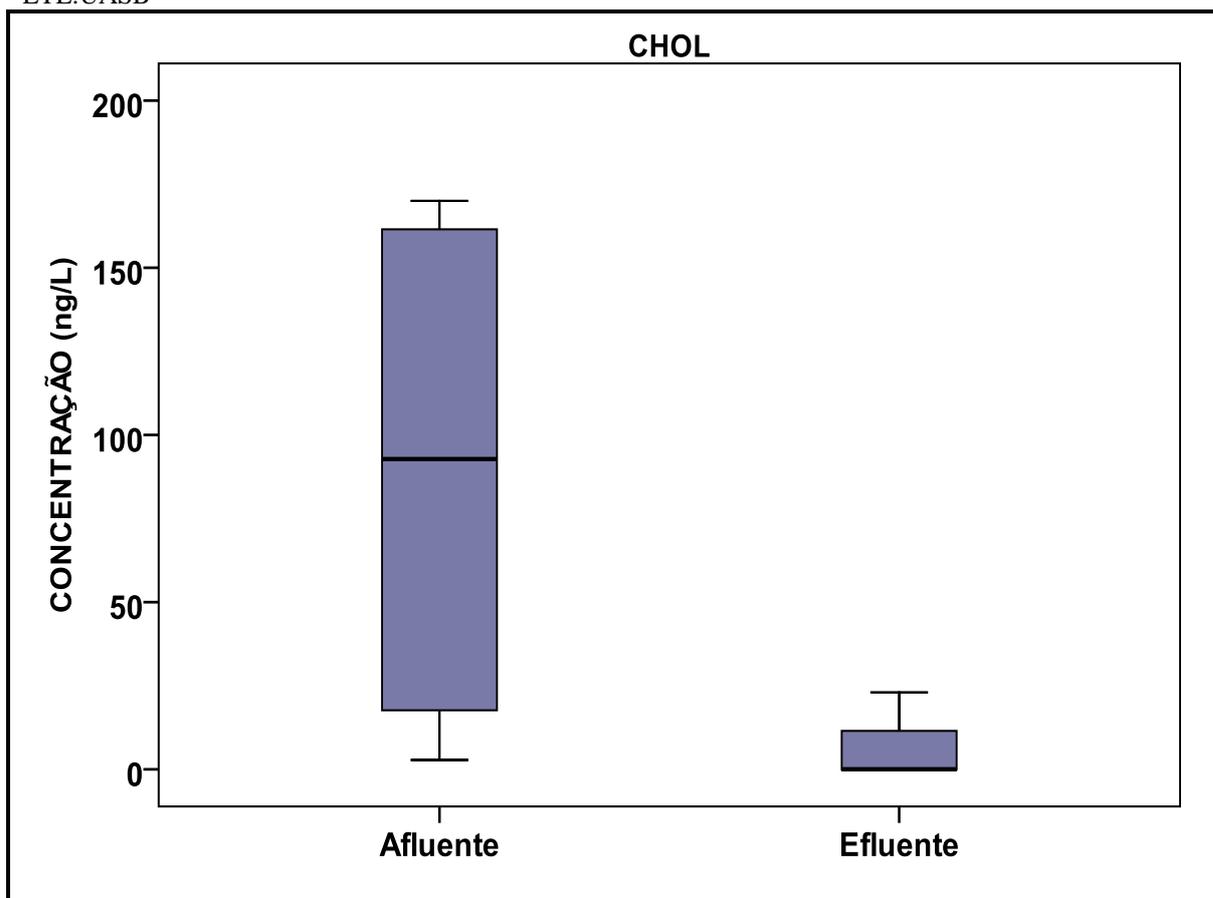
Fonte: AUTORA, 2012

A partir dos resultados obtidos observa-se que o E1 apresentou no efluente final uma concentração menor que o LD, enquanto o E2 apresentou média de 99 ng L⁻¹, semelhante ao perfil encontrado em de Mes *et al.* (2008). Os referidos autores investigaram a biodegradabilidade dos estrogênios E1, E2 e EE2 em reatores UASB em várias configurações e concluíram que sob condições anaeróbias E1 sofria redução à E2, sendo a remoção dependente do tipo de inóculo utilizado. Entretanto, o EE2 não apresentava

biodegradabilidade. Além disso, os autores observaram que a adsorção ao lodo do tanque séptico foi responsável pela redução de 32-35% dos estrogênios na fase aquosa. A redução de E1 a E2 sob condições anaeróbias também foi reportada por Paterakis *et al.* (2012).

Em se tratando do composto E2-17A, este não foi detectado nas vazões afluentes e efluente da ETE, concordando com Schlüsener e Bester (2005).

Figura 69 – Diagramas de *box plot* para as concentrações afluentes e efluente do micropoluente colesterol na ETE:UASB⁵



Fonte: AUTORA, 2012

As concentrações afluentes e efluentes do composto colesterol na ETE: UASB variaram de 2,79 -170 ng L⁻¹ e < LD -23 ng L⁻¹. Moliner-Martinez *et al.* (2010) reportaram a concentração de efluente proveniente de tanque séptico de < 4 µg L⁻¹.

Na Tabela 30 está representado o cenário geral das concentrações obtidas em todas as coletas realizadas nas 5 ETEs, sendo apresentada a concentração máxima e média no afluente e efluente sanitário.

⁵ A escala utilizada (0-200) se diferencia das demais para o composto CHOL devido às suas baixas concentrações encontradas nessa ETE específica, de forma que os resultados fossem melhores observados mantendo-se essa faixa.

Tabela 30 – Sumário de todos os compostos detectados em amostras afluente e efluente de 5 ETEs na RMF (n=25)

Composto	<i>Afluente</i>		<i>Efluente</i>	
	Máxima (ng L ⁻¹)	Média (ng L ⁻¹)	Máxima (ng L ⁻¹)	Média (ng L ⁻¹)
E1	3050	557,4	2080	213,6
E2	776	144,4	397	40,4
E2-17A	2300	266,4	1250	71,4
EE2	3180	421,4	840	124
CHOL	35200	4691,9	6630	730,4

Fonte: AUTORA, 2012

Com o objetivo de comparar as concentrações obtidas com as da literatura foi selecionado um estudo realizado nos EUAs por Hope *et al.* (2012), onde foram analisados efluentes provenientes de 52 estações de tratamento, sendo o nº de coletas realizadas 102 (n=102). Também foi utilizado como comparação o estudo de revisão realizado por Miège *et al.* (2009).

Tabela 31 – Sumário das concentrações efluentes obtidas na literatura científica

Composto	<i>Efluente</i>	
	Máxima (ng L ⁻¹)	Média (ng L ⁻¹)
E1	282 ¹	45
E2	125 ²	25
E2-17A	ND	ND
EE2	70	4,2
CHOL	9107	299,74

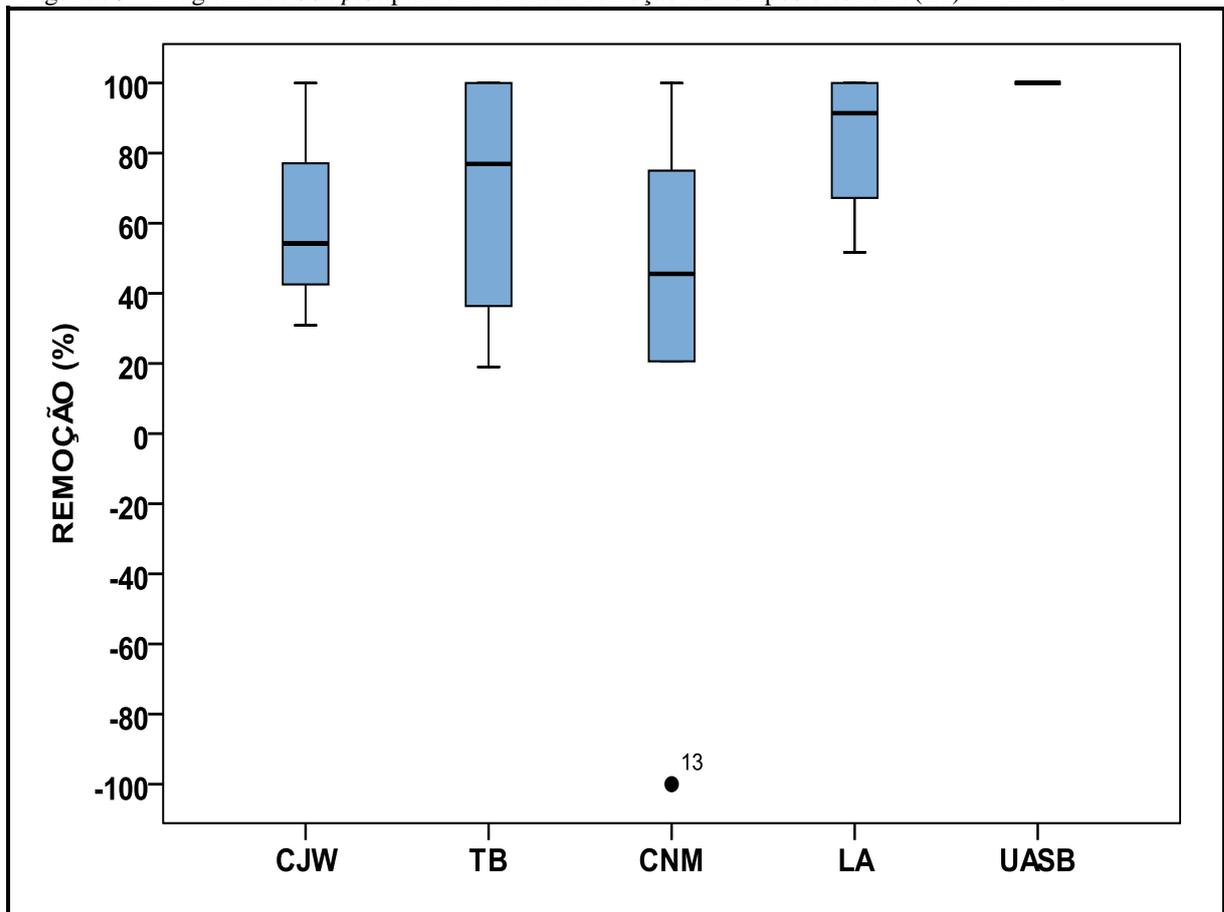
Fonte: ¹HOPE *et al.*, 2012; ²MIÈGE *et al.*, 2009.

Os resultados reportados pela literatura diferem dos encontrados durante a pesquisa, exceto o composto colesterol. No entanto, outras pesquisas realizadas no Brasil confirmam essas elevadas concentrações (GHISELLI, 2006).

5.5.2 Eficiência de remoção dos DEs e colesterol nas tecnologias de tratamento analisadas

Na Figura 70 é apresentado o perfil de eficiência de remoção do estrogênio **E1** nas ETEs selecionadas.

Figura 70 – Diagrama de *box plot* para eficiência de remoção do composto estrona (E1) em ETEs



Fonte: AUTORA, 2012

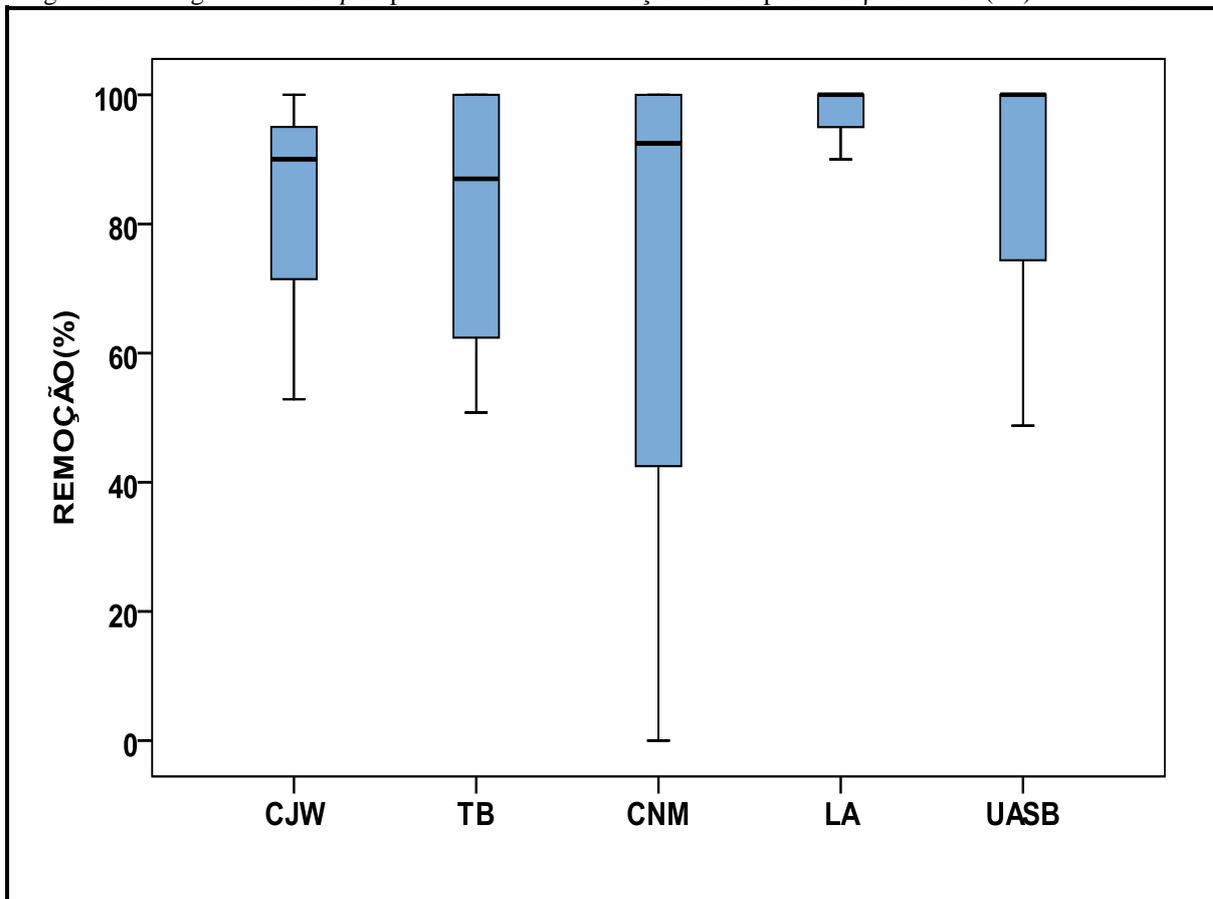
O valor médio de eficiência de remoção para E1 nas lagoas de estabilização seguidas lagoa de maturação foi de 65%, semelhante ao reportado por Coleman *et al.* (2010). Os autores ao analisarem sistemas de lagoas de estabilização obtiveram eficiências de remoção de E1 variando de 34%-100%. Servos *et al.* (2005) consideraram a remoção de estrona em lagoas de estabilização um processo mais complexo que outros estrogênios, sendo a faixa encontrada de 46% a 95%, mesmo quando um TDH total superior a 150 dias era usado nas três lagoas facultativas aeradas monitoradas. Por fim, os autores analisando várias tecnologias de tratamento observaram que quanto maior o TDH maior era a remoção dos estrogênios. Entretanto, esse comportamento não foi observado nas lagoas de estabilização

analisadas na pesquisa presente, uma vez que a ETE : CNM tinha maior TDH e apresentou menor eficiência de remoção de E1 de 28,4%. Possivelmente a baixa eficiência de remoção pode ser atribuída à rápida bio-transformação de E2 para E1, mediada pela ação dos micro-organismos, aumentando assim a concentração de E1 no efluente final, vide *outlier* nº13 (Servos *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2010). Além disso, a ETE: CNM tem uma profundidade maior do que as demais lagoas facultativas analisadas (vide Anexo A) e não dispõe de lagoas de maturação, as quais são conhecidas por possuírem capacidade de desinfecção podendo assim ser responsável pelo foto-oxidação dos DEs, o que não acontece com a tecnologia utilizando apenas lagoa facultativa, Em estudos prévios Coleman *et al.* (2000, 2004, 2005) e Zhang e Zhou (2008) reportaram degradação de estrogênios (E1 e E2) por radiação UV artificial e natural, respectivamente, sendo os dados de remoção para a radiação solar de 50% para E1 e 52% para E2 após o período de exposição solar de 75 horas.

A eficiência de remoção média de E1 no sistema de LA foi de 84%. Em um sistema de lodos ativados localizado na Noruega, Plósz *et al.* (2010) analisaram a remoção de fármacos e desreguladores endócrinos reportando uma eficiência de remoção de 100% para E1. No entanto, outros estudos discordam dos resultados obtidos, como Sim *et al.* (2011), que encontraram uma remoção reduzida para o estrogênio E1, de apenas 35%, enquanto Chang *et al.* (2011) encontraram valores de remoção de 76%, atribuindo o baixo índice a presença do anel benzeno nas estruturas dos hormônios.

Para o reator anaeróbio UASB seguido de cloração a remoção foi de 100%, a qual pode ser atribuída, além da biodegradação, à oxidação de E1 pelo agente desinfetante utilizado na ETE. Deborde *et al.* (2004) reportaram uma rápida degradação da estrona ao reagir com ácido hipocloroso (HOCl) na concentração de 1 mg L⁻¹. Os autores calcularam a cinética de reação entre os DEs e HOCl e concluíram que a eficiência de remoção em ETES pode chegar a 95% na faixa de pH 7-8, assumindo uma concentração teórica constante para HOCl de 2 mg L⁻¹ e um tempo de contato mínimo de 15 minutos. No estudo citado não foi analisado a presença de subprodutos, no entanto, outros trabalhos científicos (HU *et al.*, 2003; MORIYAMA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004) relatam a formação de produtos clorados, os quais ainda apresentam atividade estrogênica, atingindo o mesmo patamar de estrogenicidade da estrona.

Na Figura 71 são apresentadas as eficiências de remoção das ETES selecionadas para o composto **E2**.

Figura 71 – Diagrama de *box plot* para eficiência de remoção do composto 17 β -estradiol (E2) em ETEs

Fonte: AUTORA, 2012

Analisando os resultados obtidos em termos de eficiência de remoção para o E2, a tecnologia de lagoa facultativa seguida de duas lagoas de maturação forneceu, em geral, boas eficiências de remoção, com média de 81%. Os valores encontrados para E2 nas ETEs CJW e TB concordaram com valores encontrados por Servos *et al.* (2005) e Lishman *et al.* (2006) os quais obtiveram em estudos realizados em lagoas facultativas eficiências de 80 a 98%.

Já para a ETE: CNM não houve resultados remoção, ou seja, a concentração de E2 sofreu incremento de 11% no efluente, conforme também reportado por Fernandez *et al.* (2007).

Um estudo realizado no sul do Brasil, por Froehner *et al.* (2011), apresentaram resultados semelhantes ao analisar diferentes tecnologias de remoção biológica, a saber, lodos ativados, reator UASB e lagoas de estabilização (LE) representada por lagoas anaeróbias seguidas de lagoas facultativa e maturação. A melhor eficiência para remoção do E2 foi o LA (73%) seguida do UASB (66%) e com menor remoção a tecnologia de lagoas (56%), traçando assim o mesmo perfil, LA>UASB>LE, encontrado durante a presente pesquisa. As

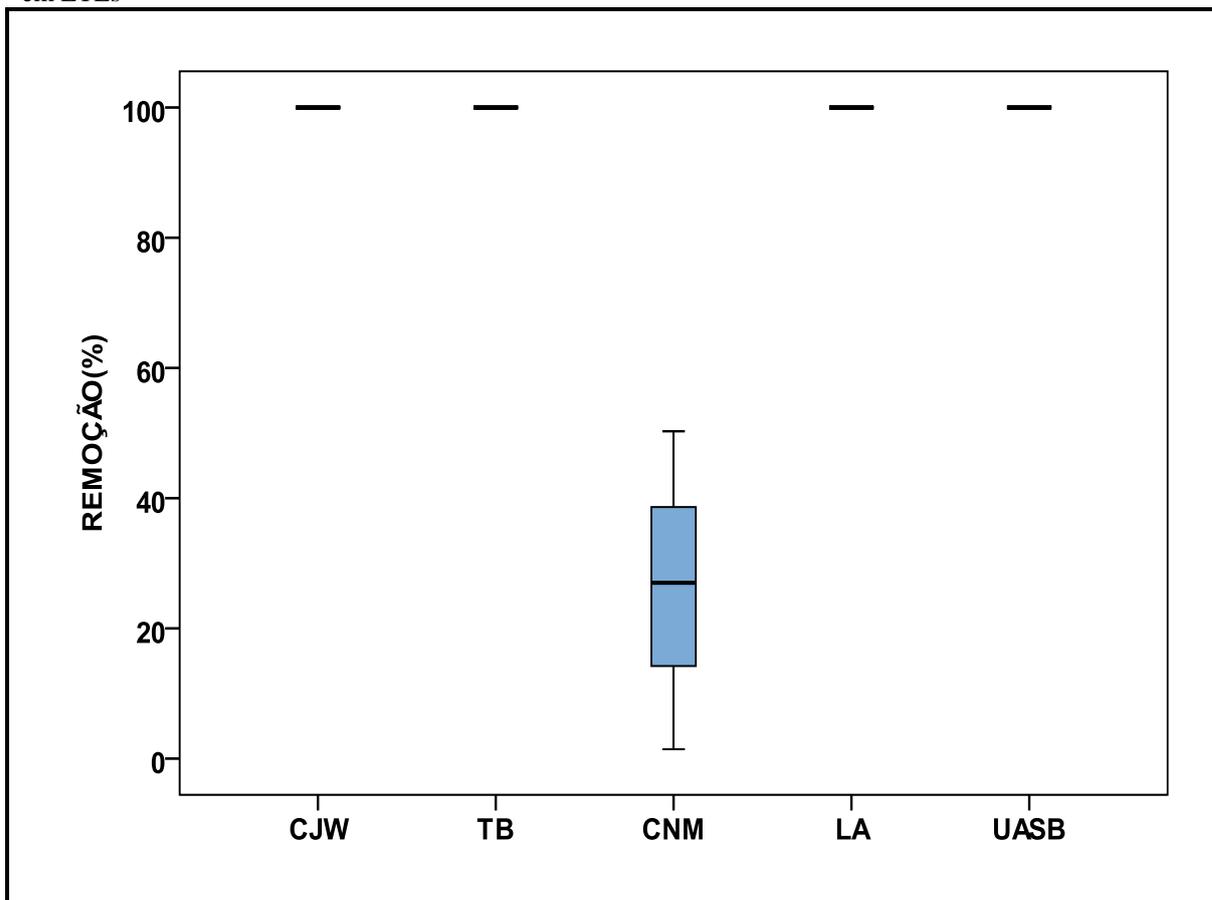
taxas médias de remoção obtidas durante a presente pesquisa foram: LA-96%, UASB-87%, LE-78%, considerando a LE (lagoa de estabilização) com e sem lagoa de maturação.

A melhor eficiência de remoção obtida para o composto E2 foi o sistema convencional de lodos ativados, atingindo um valor médio de 96%. Os principais mecanismos de remoção de compostos orgânicos hidrofóbicos em LA incluem além da transformação e degradação biológica a sorção à biomassa (STEVENS-GARMON *et al.*, 2011). No caso da biodegradação de estrogênios alguns micro-organismos vêm sendo classificados como degradadores de estrogênios (*estrogen-degrading*), dentre eles bactérias oxidante de amônia (*Nitrosomonas europaea*), bactérias nitrificantes em lodos ativados e *Sphingomonas* KC8 (SHI *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2007b; DYTCZAK *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2005). É importante mencionar que as rotas biológicas de degradação de micropoluentes em sistemas biológicos ainda são bastante desconhecidas, conforme observado por Roh *et al.* (2011) ao analisarem a biodegradação de E2 pelos organismos citados em reatores em batelada. A nitrificação ocorre quase que sistematicamente nas estações de lodos ativados operando em condições de elevada temperatura, a exemplo do Estado do Ceará (VON SPERLING, 2002). Assim, pode-se inferir que existe uma elevada probabilidade de degradação biológica do E2, no entanto não se pode precisar que micro-organismos estavam envolvidos no processo, uma vez que não foi realizada nenhuma análise de microbiologia molecular.

A elevada eficiência de remoção de E2 no sistema UASB pode ser atribuída à biodegradação, conforme reportado por Paterakis *et al.* (2012), ou ainda à etapa de cloração presente na ETE, devido à elevada capacidade de oxidação de compostos clorados, *e.g.*, apenas 1,46 mg L⁻¹ de hipoclorito de sódio (NaOCl) é capaz de decompor 100% de 50 µg L⁻¹ de E2 em apenas 10 minutos de reação (HU *et al.*, 2003). Entretanto, os subprodutos formados, dentre eles o 4-cloro-17β-estradiol (4-Cl-E2), apresentam elevada atividade estrogênica (HU *et al.*, 2003).

Os resultados em termos de eficiência de remoção do composto **E2-17A** são apresentados na Figura 72.

Figura 72 – Diagrama de *box plot* para eficiência de remoção do composto 17 β -estradiol-17-acetato (E2-17A) em ETES



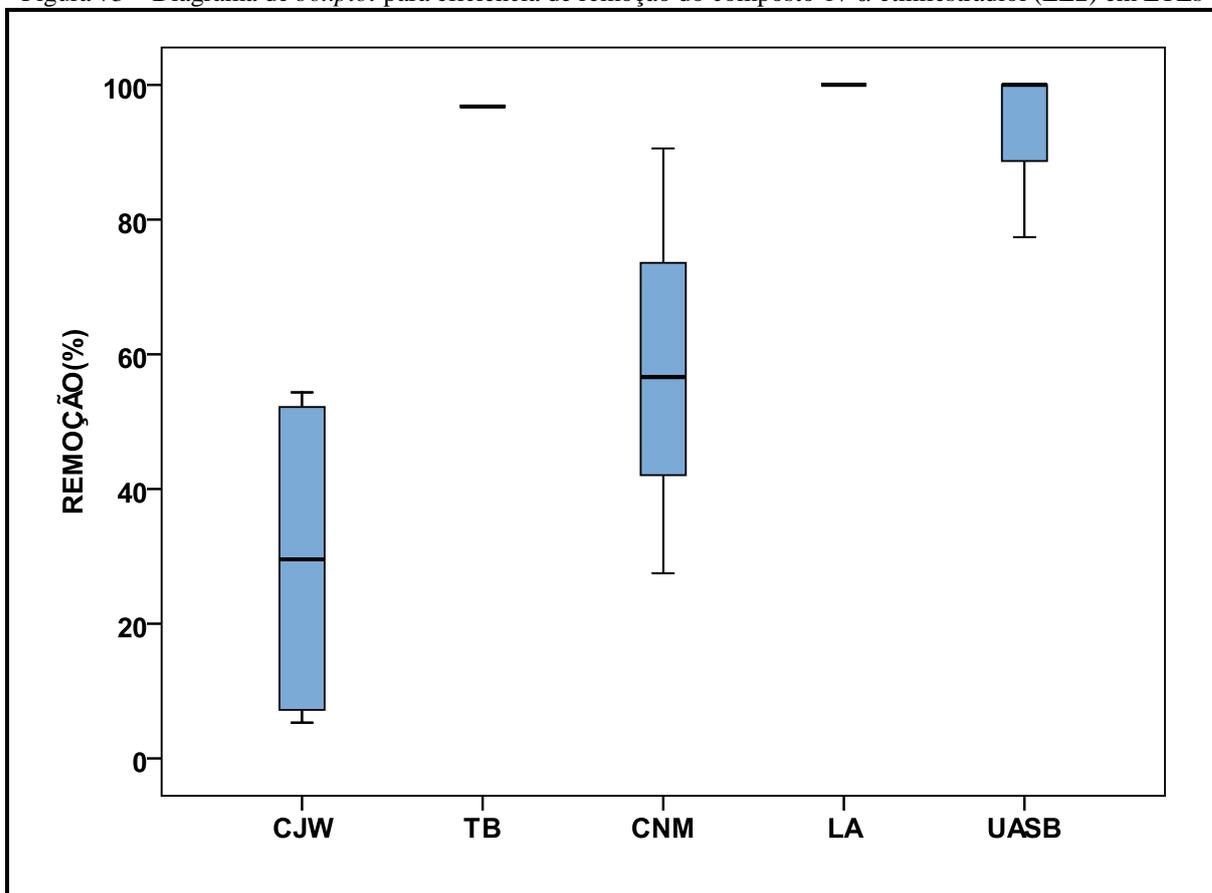
Fonte: AUTORA, 2012

Para o estrogênio analisado, as tecnologias avaliadas forneceram, em geral, resultados ótimos de remoção (100%), ou seja, o composto não foi detectado nos efluentes analisados. Os resultados obtidos da ausência do composto E2-17A em efluentes sanitários concordam algumas investigações (SCHLÜSENER; BESTER, 2005; PEDROUZO *et al.*, 2009). A exceção de elevada eficiência de remoção foi obtida pela ETE: CNM, na qual a remoção média foi de 26%. Tal fato pode ter relação com a ausência da lagoa de maturação, uma vez que as concentrações dos compostos podem ser bastante afetadas por processos de transformação abiótica como a fotólise (VIENO *et al.*, 2005).

Devido ao seu alto valor de log K_{ow} o composto E2-17A pode ter sido adsorvido à biomassa das lagoas de estabilização e nas demais tecnologias, como reportado por Nieto *et al.* (2008), os quais analisaram o composto E2-17A em sedimentos de sistema de tratamento de esgoto doméstico (não sendo especificado qual tipo de tratamento) e detectaram a presença do estrogênio. No entanto, sua concentração ficou abaixo do LQ, sendo sua concentração obtida $175 \mu\text{g.kg}^{-1} < \text{E2-17A} < 375 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

O perfil de eficiência de remoção para o composto **EE2** é apresentado na Figura 73.

Figura 73 – Diagrama de *boxplot* para eficiência de remoção do composto 17 α -etinilestradiol (EE2) em ETEs



Fonte: AUTORA, 2012

Na ETE: CJW foi obtida a menor eficiência de remoção, média de 29,7%, concordando com o obtido por Ying *et al.* (2008), os quais encontraram uma remoção para EE2 de apenas 25%. Os autores analisaram uma ETE composta de 10 lagoas de estabilização (anaeróbias e aeróbias) em série e concluíram que os desreguladores endócrinos mais persistentes após tratamento com diferentes tecnologias eram o E1 e EE2.

Já na ETE: TB os resultados obtidos de remoção foram satisfatórios, não sendo detectado EE2 no efluente final da lagoa de maturação, semelhante ao resultado relatado por Gomez *et al.* (2007), os quais obtiveram 90-95% de eficiência de remoção da atividade estrogênica em lagoas de estabilização.

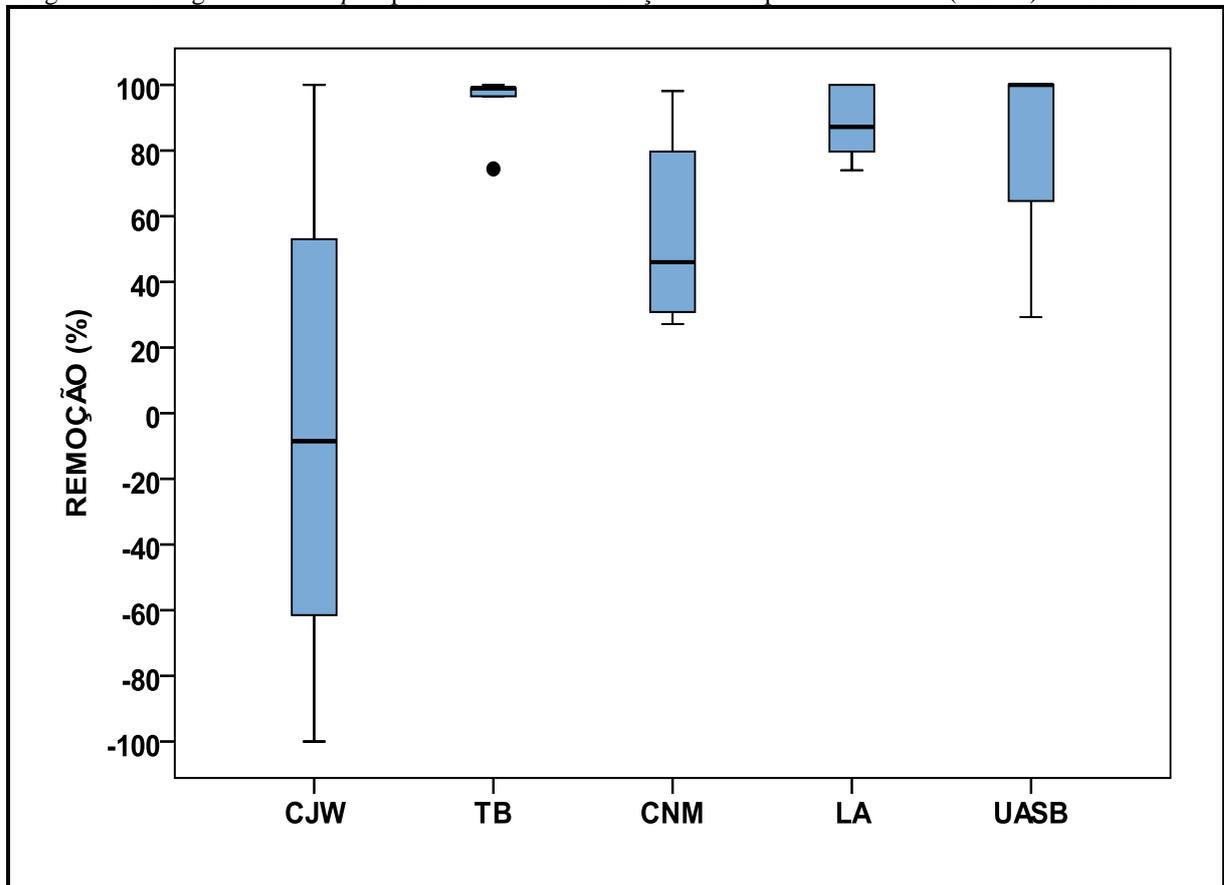
Ao analisar a eficiência de remoção de EE2 na ETE:CNM observou-se que a taxa de 58,4% é maior do que a relatada por Williams *et al.* (2007), os quais obtiveram uma

eficiência de apenas 25% para o composto EE2 em lagoas de estabilização sem a presença de lagoas de maturação.

A eficiência obtida no sistema de tratamento de LA foi considerada 100%, discordando dos resultados reportados por alguns pesquisadores, com eficiências bem reduzidas, em alguns casos chegando a valores de apenas 3 a 5,6% (KANDA E CHURCHLEY, 2008; GHISELLE, 2006). A persistência do EE2 durante o tratamento de lodos ativados já havia sido observada em estudos prévios (WEBER *et al.*, 2005), ao contrário de Muller *et al.* (2008) e Joss *et al.* (2004), que relataram eficiências maiores que 90% para EE2. Yi *et al.* (2006) atribuíram a capacidade de micro-organismos de degradar o EE2 à presença da enzima catalisadora da etapa de nitrificação, a saber amônia monooxigenase (AMO). Yi *et al.* (2011) observaram que o EE2 era mineralizado em sistemas biológicos convencionais, além da formação de metabólitos, contribuindo desta forma para a elucidação da rota de biodegradação do estrogênio sintético.

Na Figura 74 são apresentados os resultados de eficiência de remoção para o composto **CHOL**.

Figura 74 – Diagrama de *box plot* para eficiência de remoção do composto colesterol (CHOL) em ETEs



Fonte: AUTORA, 2012

A menor eficiência de remoção do composto colesterol foi encontrada na ETE:CJW, em algumas coletas realizadas houve um aumento na concentração do composto quando esse passava pelo sistema de tratamento.

Os resultados de eficiência média obtidos nas duas outras ETEs de lagoas de estabilização, TB e CNM, foram de 93% e 56%, respectivamente, corroborando com Fernandez *et al.* (2007), os quais reportaram eficiência de 85% para remoção do CHOL em sistemas de lagoas de estabilização operadas no Canadá.

Para a tecnologia do tipo lodos ativados, avaliada na presente pesquisa, a remoção média do composto colesterol foi de 88%, sendo considerado assim o segundo sistema mais eficiente quando comparado às outras tecnologias de tratamento avaliadas. Tal comportamento está de acordo com as observações de Niven *et al.* (2001), onde o esteróide foi transformado em CO₂ durante o tratamento aeróbio por lodos ativados. Ghiselli (2006) encontrou uma eficiência de 85% de remoção de colesterol em uma ETE de lodos ativados situada no estado de São Paulo.

Com relação à tecnologia UASB a eficiência de remoção variou de 29% a 100%, os dados obtidos corroboram com os de Harder e Probian (1997), os quais analisaram a biodegradação do composto colesterol por um grupo de micro-organismos em condições anaeróbias, os autores chegaram à eficiência de remoção de 100%.

Na Tabela 32 estão apresentadas as eficiências de remoção dos micropoluentes nas ETEs selecionadas, em que o composto colesterol não foi incluído no cálculo devido o mesmo não ser classificado como desregulador endócrino. A ETE : CNM apresentou menor valor de remoção, possivelmente pela ausência de lagoas de maturação, as quais não somente aumentam o TDH total no sistema como também aumentam a fotodegradação de alguns compostos pelo fato de serem mais rasas. As tecnologias LA+ Cl e UASB+Cl apresentaram boas eficiências de remoção.

Tabela 32 – Eficiência média de remoção (%) dos desreguladores endócrinos em várias tecnologias

Composto	Eficiência média de remoção (%) ⁶				
	CJW	TB	CNM	LA+CI	UASB+CI
E1	61,7	68,3	28,4	77,5	100
E2	81	81,2	71,2	96	87,2
E2-17A	100	100	26,2	100	100
EE2	29,7	96,8	58,2	100	94,4
MÉDIA	68,1	86,6	46,0	93,4	95,4

Fonte: AUTORA, 2012

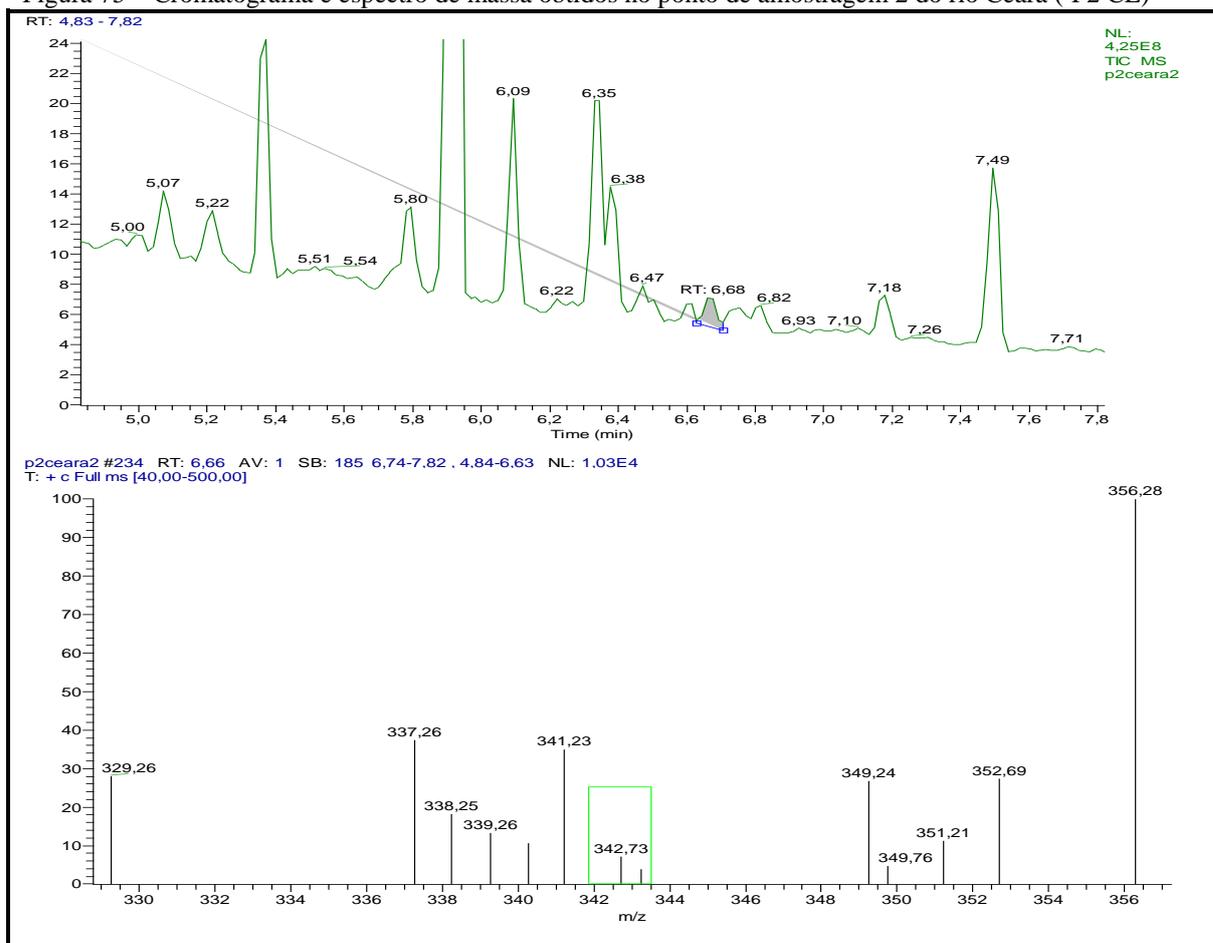
Embora a biodegradação seja uma das transformações mais significantes no tratamento de esgoto, no caso dos desreguladores endócrinos o processo é limitado do ponto de vista cinético devido às baixas concentrações dos compostos verificadas no afluente (BRANDT, 2012). Segundo Joss *et al.* (2006), a maior parte dos micropoluentes apresentam cinética de degradação de pseudo-primeira ordem, o que significa que a taxa de transformação biológica é diretamente proporcional à concentração dos compostos presentes na fase líquida.

5.5.3 Identificação dos desreguladores endócrinos e micropoluente colesterol em águas superficiais

No primeiro ponto de amostragem rio Ceará, P1CE, localizado na zona urbana da cidade de Fortaleza no bairro Tapebas, nenhum dos compostos analisados durante a pesquisa foi detectado, ou ainda, os mesmos se encontravam em uma concentração abaixo do limite de detecção do método, mesmo sendo um corpo receptor que recebe esgotos sanitários quer na forma *in natura* quer após uma ETE. Não foram encontrados os estrogênios analisados durante a pesquisa, corroborando com os resultados reportados por Kuster *et al.* (2009) em análises de águas superficiais no Brasil (estado do Rio de Janeiro) para os estrogênios E1, E2 e EE2. Na Figura 75 é apresentado o cromatograma juntamente com o espectro de massa (MS) do composto E1 detectado no P2CE. Observa-se no cromatograma que o pico no tempo de retenção 6,68 minutos correspondente ao E1; já no MS o pico base do E1 (m/z 342) está em destaque.

⁶ A eficiência de remoção foi considerada 100% quando a concentração do composto no efluente final encontrava-se abaixo do LD/LQ.

Figura 75 – Cromatograma e espectro de massa obtidos no ponto de amostragem 2 do rio Ceará (P2 CE)



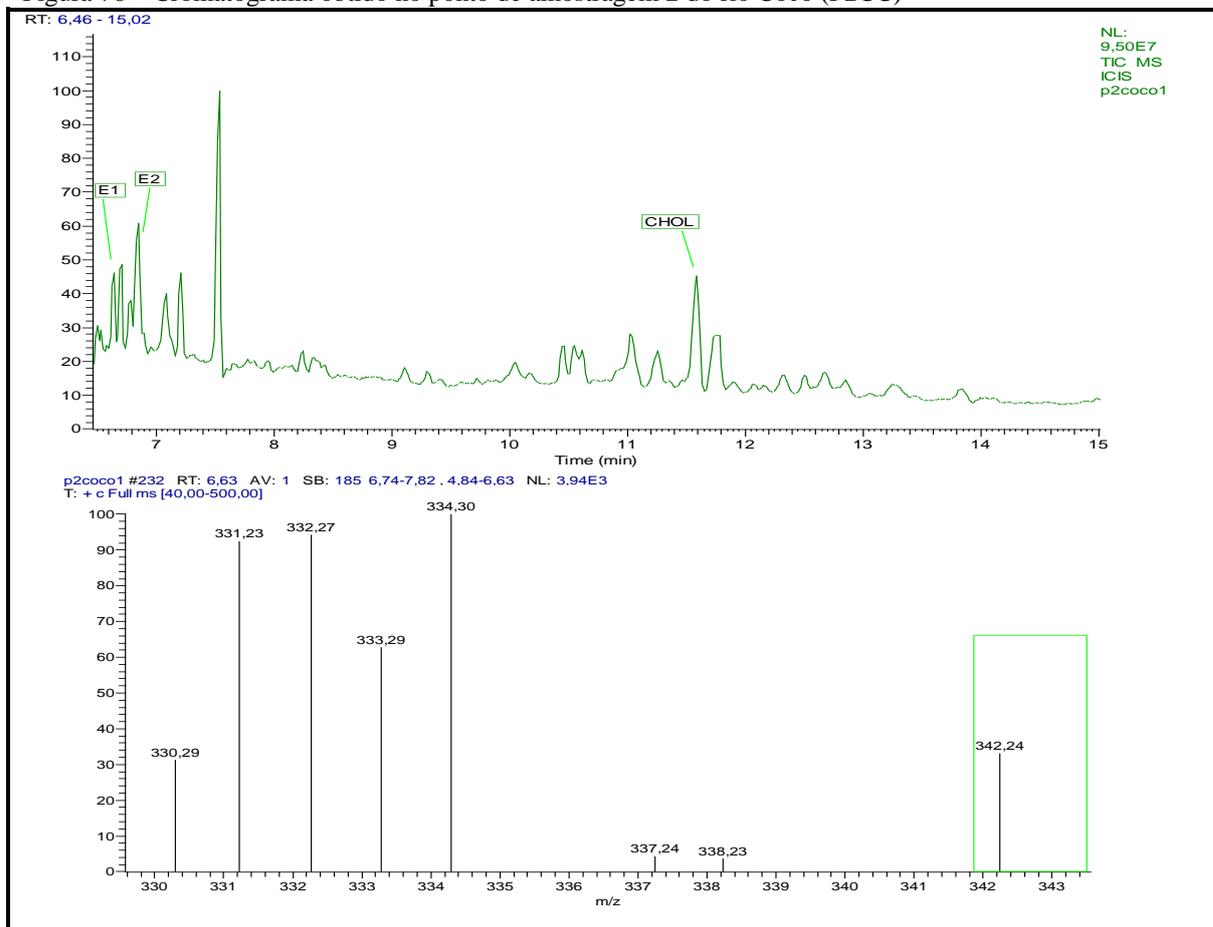
Fonte: AUTORA, 2012

No segundo ponto de coleta do mesmo rio, P2CE, dentre os compostos analisados foi identificado o estrogênio estrona (Figura 75), sendo a concentração encontrada de 3,65 ng L⁻¹. Tal concentração é menor do que a encontrada em águas superficiais de outras regiões brasileiras, tais como 600 ng L⁻¹ (LOPES *et al.*, 2010) e 3500 ng L⁻¹ (GHISELLE, 2006). Entretanto, esse resultado concorda com o encontrado por Boyd *et al.* (2003), onde a maioria dos hormônios ficaram abaixo do LD, exceto a estrona, a qual apresentou-se em concentração na faixa de 1,5-5,0 ng L⁻¹.

No primeiro ponto de coleta do rio Cocó, P1CC, localizado na zona urbana da cidade de Fortaleza no bairro de Boa Vista, foi identificado o composto estrona, na concentração de 297 ng L⁻¹. O resultado mostra um alto nível de contaminação devido à infraestrutura insuficiente de esgotamento sanitário, e lançamento de esgoto *in natura* no corpo d'água.

Na Figura 76 é apresentado o cromatograma obtido durante a análise do ponto 2 de coleta do rio Cocó, destacando os compostos E1, E2 e CHOL. Além do cromatograma, pode ser visualizado o espectro de massa obtido para o E1 e em destaque o seu m/z .

Figura 76 – Cromatograma obtido no ponto de amostragem 2 do rio Cocó (P2CC)



Fonte: AUTORA, 2012

No segundo ponto de coleta, P2CC, dentre os compostos analisados foram identificados os estrogênios naturais E1 e E2 e seu precursor, o hormônio colesterol, nas concentrações de $212,8 \text{ ng L}^{-1}$; $256,3 \text{ ng L}^{-1}$ e $1175,0 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente. Moreira *et al.* (2011) também detectaram a presença do E2 ($62,6 \text{ ng L}^{-1}$) em amostras de águas superficiais no estado de Minas Gerais. Bicchi *et al.* (2009) reportaram a presença dos compostos E1 e EE2 em corpos receptores próximos à ETEs (2 Km a jusante) nas concentrações máximas de $592,7 \text{ ng L}^{-1}$ para E1 e $4381,6 \text{ ng L}^{-1}$ para EE2. Os autores atribuem a elevada concentração dos compostos em águas superficiais à elevada estabilidade aos processos de tratamento, além da clivagem dos estrogênios conjugados para suas formas livres.

A concentração detectada durante a pesquisa (1175 ng L⁻¹) corrobora com o resultado reportado por Focazio *et al.* (2008), os quais detectaram a concentração de 2000 ng L⁻¹ do esteróide natural em águas superficiais nos EUA.

Além da identificação dos estrogênios nos rios citados também já foram detectados metais pesados (classificados como DEs) em ostras coletadas nas proximidades da foz do rio Cocó e Ceará (GONÇALVES *et al.*, 2007). As concentrações obtidas para cádmio (Cd) e zinco (Zn) ficaram acima do máximo valor permitido, reforçando a hipótese lançamento de fontes pontuais como, por exemplo, esgoto bruto em águas superficiais devido a grande quantidade de esgotos clandestinos, além do adensamento urbano e a disposição inadequada de resíduos às margens dos recursos hídricos.

O índice de contaminação dos corpos d'água pode ser corroborado pelos resultados de análises físico-químicas apresentados na Tabela 33. Os parâmetros que não se enquadram nos VMP estão destacados em negrito.

Tabela 33 – Parâmetros físico-químicos dos pontos de amostragem nos rios Ceará e Cocó

PARÂMETROS	P1 CC	P2CC	P1 CE	P2 CE	VMP ¹
Alcalinidade	156	140,29	227,86	113,43	ND ²
Cloretos (mg L ⁻¹)	214	11041,64	7591,45	19695,30	ND
Coliformes termotolerantes (<i>E.Coli</i>) (UFC/ 100 mL)	>2419	>2419,6	>2419,6	>2419,6	< 1.000
Cor (Pt-Co)	106,00	46,10	188,00	30,40	nível de cor natural do corpo de água
DBO ₅ (mg O ₂ L ⁻¹)	3,62	1,29	4,61	1,81	ND
DQO (mg O ₂ /L ⁻¹)	116,23	187,07	95,77	69,00	ND
Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	258,75	3674,25	2653,74	2587,50	ND
Fósforo total (mg P L ⁻¹)	2,33	0,3214	2,83	0,13	0,124
Nitrato (mg NO ₃ -N L ⁻¹)	1,39	13,02	13,74	10,30	0,4
Nitrito (mg NO ₂ -N L ⁻¹)	0,0063	0,0902	0,0518	0,0132	0,07
Nitrogênio amoniacal total (mg L N ⁻¹)	11,90	0,98	6,16	ND	0,40
Sulfato (mg SO ₄ L ⁻¹)	25,69	77,25	115,73	98,44	ND
Sulfeto (mg S L ⁻¹)	0,38	0,57	0,38	1,30	0,002
Turbidez (NTU)	30,00	3,00	55,00	12,00	ND
PARÂMETROS DE CAMPO					
pH	ND	7,49	7,26	8,09	6,5 a 8,5
OD (mg O ₂ L ⁻¹)	ND	16,6	4,65	11,53	> 5,0

Fonte: AUTORA, 2012

¹Valor máximo permitido segundo Resolução CONAMA n°357/2005 - Classe I Águas Salobras (BRASIL, 2005) ²Não determinado

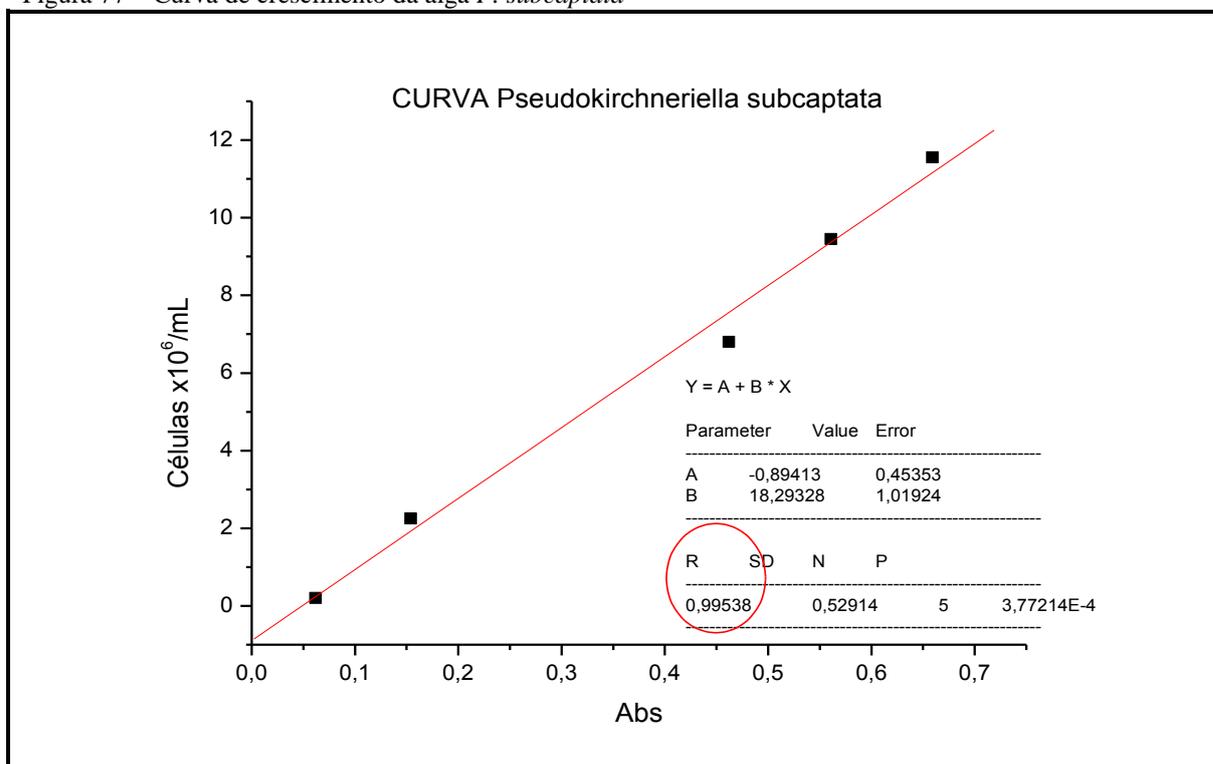
Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e bacteriológicas indicam a presença de contaminação antropogênica, uma vez que parâmetros como fósforo, nitrogênio amoniacal total e coliformes termotolerantes apresentaram valores acima do máximo permitido pela Resolução CONAMA (357/2005), sendo as águas superficiais analisadas provavelmente utilizadas como corpos receptores de esgoto *in natura*, além do uso por parte da população, como foi relatado por moradores próximos aos pontos de amostragem. Tal fato torna o cenário apresentado preocupante, uma vez que foram detectados DEs e outros poluentes nos corpos d'água e a exposição da população a esses compostos podem trazer malefícios à saúde humana em longo prazo.

5.6 Estudos Ecotoxicológicos

5.6.1 Curva de crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcaptata*

Na Figura 77 está apresentada a curva de crescimento para a alga *P. subcaptata*, número de células/ mL *versus* valor de absorbância.

Figura 77 – Curva de crescimento da alga *P. subcaptata*



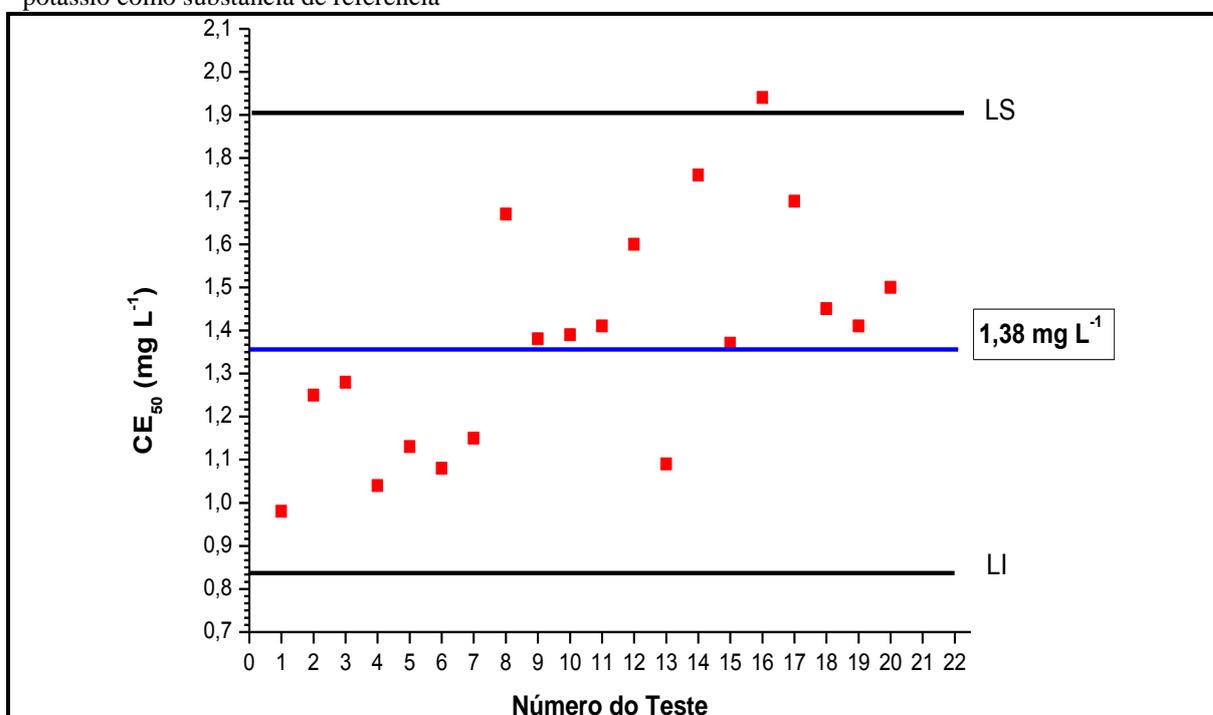
Fonte: AUTORA, 2012

Observa-se que a mesma apresentou valor de coeficiente de correlação linear satisfatório ($R > 0,99$), mostrando o crescimento de forma linear até o 14º dia de cultivo, apresentando fase estacionária a partir dessa data.

5.6.2 Ensaio de sensibilidade

Na Figura 78 está apresentada a carta controle de sensibilidade do cultivo da *D. magna* (24 horas) utilizando dicromato de potássio como substância de referência.

Figura 78 – Carta controle de sensibilidade do cultivo da *D. magna* (24 horas) utilizando dicromato de potássio como substância de referência



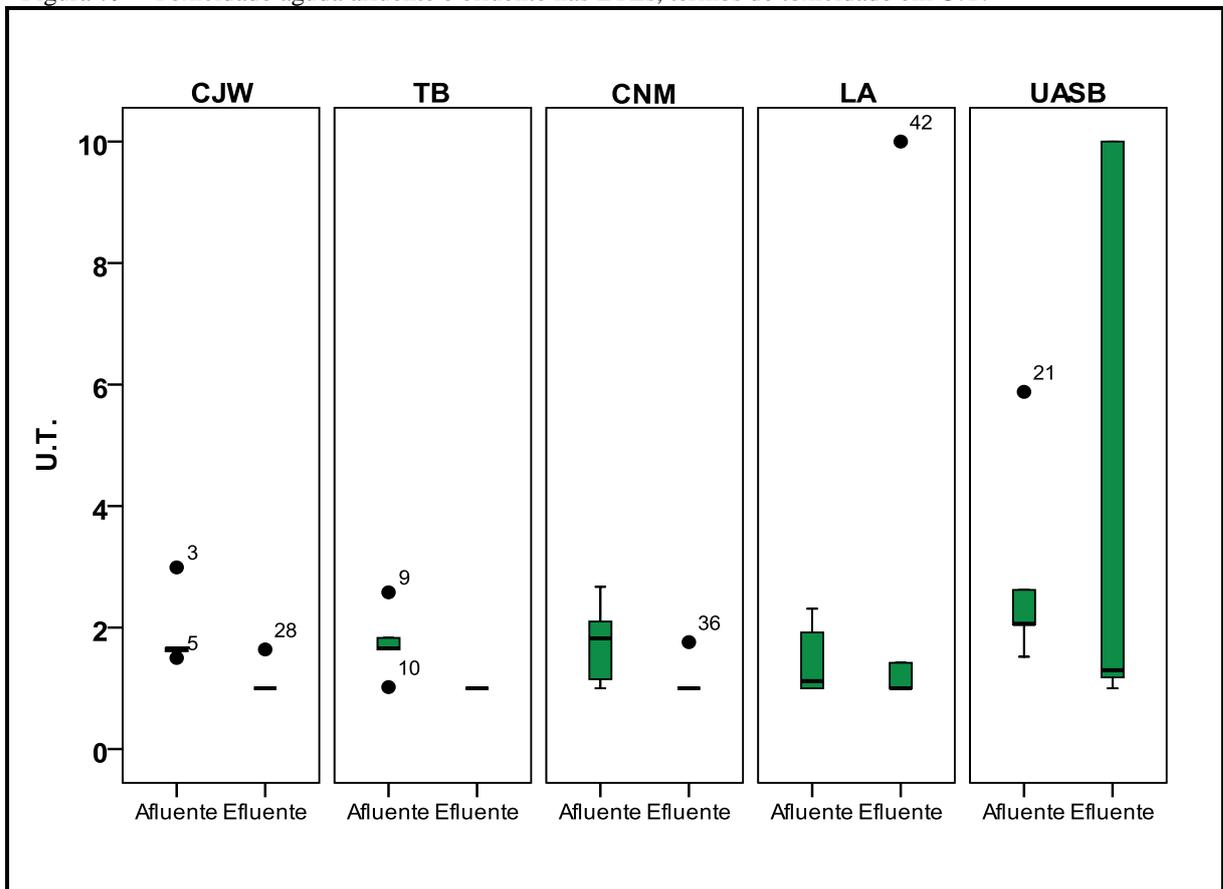
Fonte: AUTORA, 2012

O cultivo dos organismos-teste no período de execução desta pesquisa foi realizado com sucesso, fato assegurado pelos resultados dos testes de sensibilidade desenvolvidos. A $CE_{50\ 24h}$ média para a substância de referência dicromato de potássio foi de $1,38 \pm 0,26\ \text{mg L}^{-1}$ com coeficiente de variação de 19%, o que assegura a credibilidade dos testes desenvolvidos pois a sensibilidade do cultivo esteve dentro do recomendado pelas normas internacionais (ISO 6341, 1996).

5.6.3 Ensaio de toxicidade aguda

Na Figura 79 são apresentados os diagramas de *box plot* onde são mostrados os resultados obtidos durante os ensaios de toxicidade aguda em termos de U.T. (unidade tóxica: $1 \text{ U.T.} = 100/C_{50-48h}$), para afluentes e efluentes das ETEs. Já na Figura 80 os resultados são apresentados em termos de eficiência de remoção de compostos tóxicos nas ETEs analisadas. Nos ensaios de toxicidade aguda não houve mortalidade dos grupos controle.

Figura 79 – Toxicidade aguda afluente e efluente nas ETEs, termos de toxicidade em U.T.



Fonte: AUTORA, 2012

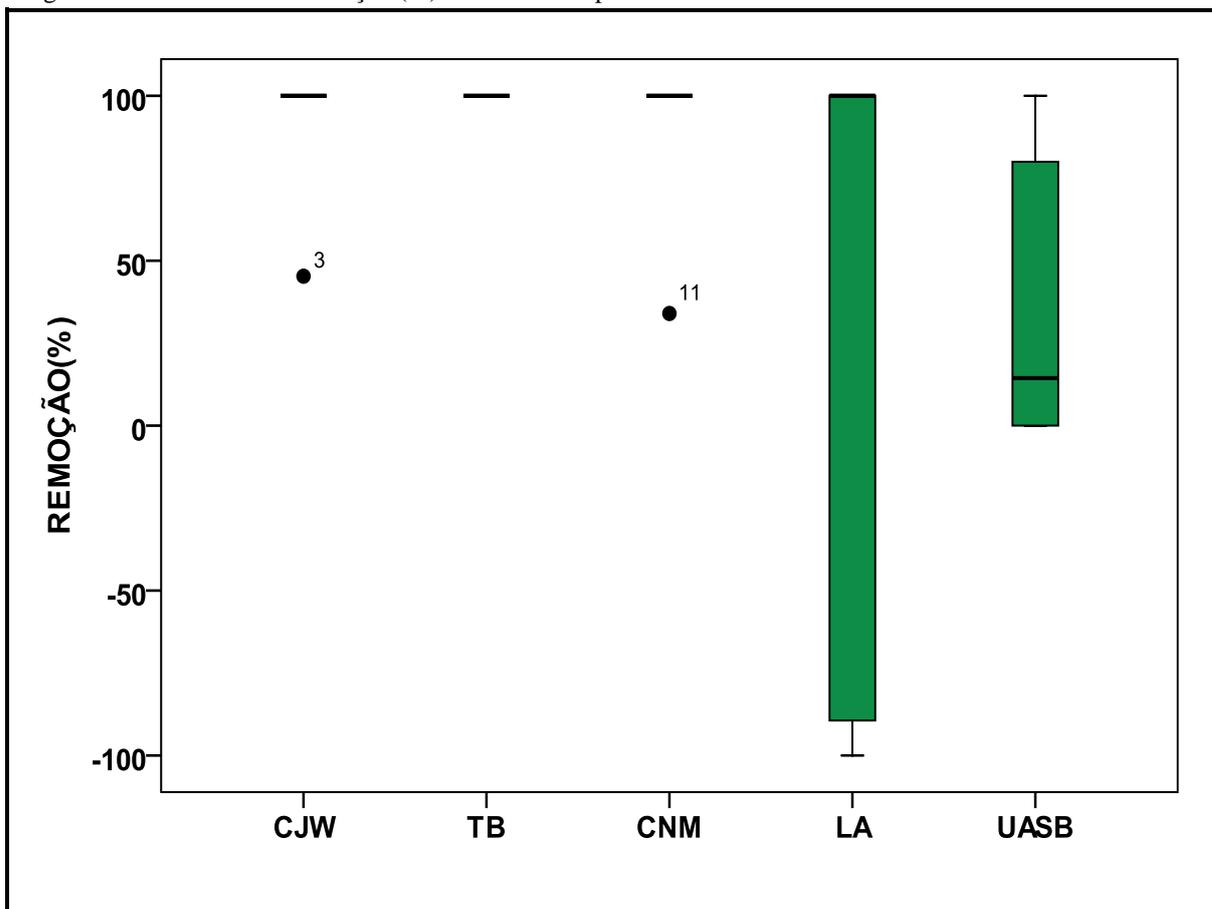
Os resultados obtidos a partir do efluente proveniente da ETE : TB não apresentaram toxicidade aguda. Por outro lado, nos efluentes das ETEs CJW e CNM os valores de CE_{50-48h} , em apenas uma das coletas, foi de 1,64 U.T. (61%) e 1,75 U.T. (57%), respectivamente (*outliers* nº 28 e 36), sendo classificadas pelo IBAMA (1987) como amostras moderadamente tóxicas. O *outlier* nº 28 pode ser justificado pelo elevado valor de DQO de $442 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ quando comparado aos demais valores obtidos nas amostragens que não apresentaram toxicidade (média de $200 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Semelhantemente, o valor de DQO obtido

na ETE:CNM foi de $390 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, o que comprova a presença de compostos tóxicos no efluente. No entanto, não há como afirmar que composto ou compostos são responsáveis pela toxicidade aguda, assim como não se pode inferir que sejam os desreguladores endócrinos presentes, uma vez que os mesmos precisam estar em concentrações elevadas para produzirem efeitos agudos em organismos aquáticos. Conforme foi discutido anteriormente, os DEs encontram-se em baixas concentrações, na ordem de ng L^{-1} .

Os valores atípicos representados pelos *outliers* indicam a variação de composição dos afluentes e efluentes, podendo ser atribuído à variação sazonal durante as amostragens (vide Anexo C)

Nos efluentes das ETEs LA e UASB ainda há presença de substâncias tóxicas aos organismos aquáticos. Segundo a Resolução CONAMA Nº 430/2011 em seu artigo 18º o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor. Provavelmente os resultados elevados de toxicidade (U.T.) estão relacionados com a realização da etapa de cloração nas ETEs. Emmanuel *et al.* (2004) determinaram a correlação existente entre a presença de subprodutos da cloração (compostos orgânicos halogenados) e toxicidade aguda da *Daphnia magna* ao analisarem efluentes hospitalares clorados com hipoclorito de sódio (NaOCl), um dos agentes desinfetantes mais utilizados em ETEs. Os autores obtiveram valores médios de 44 U.T., com concentração de cloreto variando de 63-359 mg L^{-1} . Segundo Metcalf e Eddy (1991) a faixa de cloreto encontrada em efluentes sanitários clorados pode variar de 30 a 100 mg L^{-1} .

Figura 80 – Eficiência de remoção (%) de toxicidade por ETE selecionada



Fonte: AUTORA, 2012

As ETEs que utilizam a tecnologia de lagoas de estabilização mostraram-se eficientes na remoção dos compostos tóxicos para o bioindicador *Daphnia magna*, com exceção de 2 pontos *outliers* n° 3 (45%) e 11 (34%), obtidos nas ETEs CJW e CNM. Tal comportamento pontual apontado nos *outliers* pode ser atribuído à baixa remoção de carga orgânica, uma vez que o valor de remoção de DQO ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$) foi de apenas 32% nos referidos dias da coleta.

Para a ETE utilizando a tecnologia UASB os resultados obtidos apresentaram uma eficiência média de remoção de toxicidade de 39%. Tal comportamento foi diferente dos obtidos por Laitano e Matias (2006) e Nieto (2000), os quais obtiverem eficiências de remoção em reatores anaeróbios de 81 – 98%. Tais resultados contribuem para inferência da presença de cloro residual no efluente proveniente da tecnologia UASB analisada na presente pesquisa.

Os resultados obtidos na ETE: LA apresentaram os menores valores de eficiência de remoção de toxicidade, chegando a apresentar eficiências negativas, ou seja, o afluente

apresentou menor toxicidade que o efluente (Figura 79), como mostrado no *outlier* n° 42. Provavelmente, o aumento de toxicidade deve-se à presença de cloro residual no efluente, uma vez que efluente era coletado após a etapa de cloração. Agentes desinfetantes como hipoclorito de sódio (NaOCl) são amplamente utilizados na etapa de desinfecção de efluentes, esses produtos químicos podem causar um elevado efeito tóxico à organismos como a *Daphnia* (KIM *et al.*, 2003). Ton *et al.* (2012) obtiveram uma CE_{50-48h} de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ para o NaOCl, mostrando o alto nível de toxicidade do composto à *D. magna* em baixas concentrações.

5.6.4 Ensaio de toxicidade crônica

Em termos de sobrevivência os valores de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34 – Valores de CENO e CEO para sobrevivência durante o ensaio de toxicidade crônica

Amostra	CENO	CEO
CJW	30%	10%
TB	30%	NS
CNM 1°	30%	NS
CNM 2°	30%	NS
LA	ND	5%
UASB	ND	5%
Hormônios	$8 \mu\text{g L}^{-1}$	NS

Fonte: AUTORA, 2012

ND: não determinado (valor não foi possível calcular)

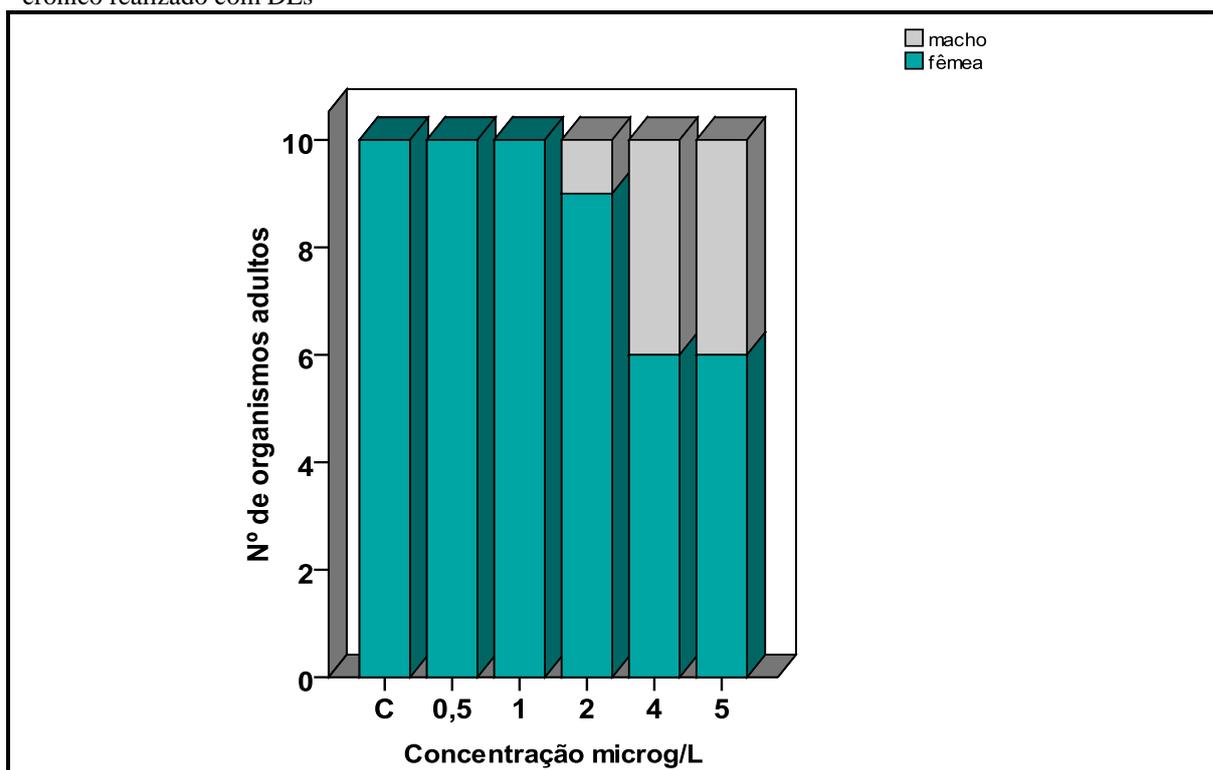
NS: Não possui efeito significativo

Foram encontrados os maiores valores de toxicidade crônica nos efluentes provenientes dos sistemas: Lodos Ativados e UASB, apresentando valor de CEO de 5%, ou seja, na concentração de 5% houve efeito significativo da sobrevivência dos organismos. Todas as concentrações testadas apresentaram $p < 0,05$, portanto, não foi possível calcular CENO. O fato ocorrido nas duas coletas realizadas para ambos efluentes pode ser atribuído à presença de cloro residual, uma vez que o efluente foi coletado após a etapa de cloração. Segundo Zeng *et al.* (2012) o cloro residual livre é extremamente tóxico para as *D. magna*, em concentrações de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ o índice de mortalidade chega a 100%.

No ensaio realizado com a solução multielementar de estrogênios o efeito crônico de sobrevivência não foi observado, no entanto, foi observado um efeito crônico em termos de mudança de sexo, apresentando os valores de CENO: $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e CEO: $4 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Figura 81 está apresentado o gráfico com o número de machos formados durante os 21 dias de ensaio.

Figura 81 – Quantidade de organismos adultos distribuídos por gênero ao longo dos 21 dias para o teste crônico realizado com DEs



Fonte: AUTORA, 2012

Os resultados de mudança de sexo apresentados confirmam a capacidade estrogênica dos DEs em organismos aquáticos causando alterações no desenvolvimento de características sexuais secundárias, conforme observado por Olmstead e Leblanc (2000). A partir do ensaio crônico comprovou-se a correlação entre a presença de desreguladores endócrinos e a alteração de sexo em *D. magna*. Vale ressaltar que nos ensaios utilizando os efluentes provenientes das lagoas de estabilização foi observado a mudança de sexo em organismos ao longo de teste, no entanto esses valores não foram computados devido não ter ocorrido diferença significativa ao ser aplicado o teste estatístico (valor $p > 0,05$). A correlação entre a presença de DEs e a mudança de sexo em *Daphnias* foi comprovado por Dang *et al.* (2012) ao compilarem 135 trabalhos utilizando o bioindicador exposto à 86 compostos classificados como desregulador endócrino.

Os resultados apresentados divergem dos estudos realizados por Goto e Hiromi (2003), uma vez que os autores não detectaram a mudança de sexo em *Daphnias* na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de EE2, enquanto que durante essa pesquisa a partir da concentração de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ da solução multielementar obteve-se diferenças significativas de alteração sexual. É importante destacar que Goto e Hiromi (2003) expuseram o organismo aos componentes ativos do contraceptivo, enquanto que a presente pesquisa expôs a um grupo de desreguladores endócrinos, formulando a hipótese de que a alteração foi, possivelmente, causada por outro DE diferente do EE2, no caso E1, E2 ou E2-17A.

Os valores de CENO e CEO para a avaliação da reprodução, ou seja, do número de neonatos gerados por fêmea são apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 – Valores de CENO e CEO para reprodução durante o ensaio de toxicidade crônica

Amostra	CENO	CEO
CJW	30%	10%
TB	20%	30%
CNM 1°	30%	NS
CNM 2°	30%	NS
LA	ND	ND
UASB	ND	ND
Hormônios	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\mu\text{g L}^{-1}$

Fonte: AUTORA, 2012

Legenda:

NS: Não houve efeito significativo

ND: Não foi possível determinar

De acordo com os resultados obtidos, apenas no efluente proveniente da lagoa da maturação da ETE de TB foi observado efeito crônico tóxico em termos de diminuição da reprodução dos organismos adultos na concentração de 30%, sendo considerada uma amostra tóxica quando comparada ao controle. Apesar do valor de CEO obtido para o efluente da ETE CJW (10%), a amostra não pode ser considerada tóxica, uma vez que na concentração de 30% não foi observado efeito na reprodução, necessitando assim de um novo teste crônico para o efluente, ou ainda, de um monitoramento da ETE em termos de toxicidade crônica.

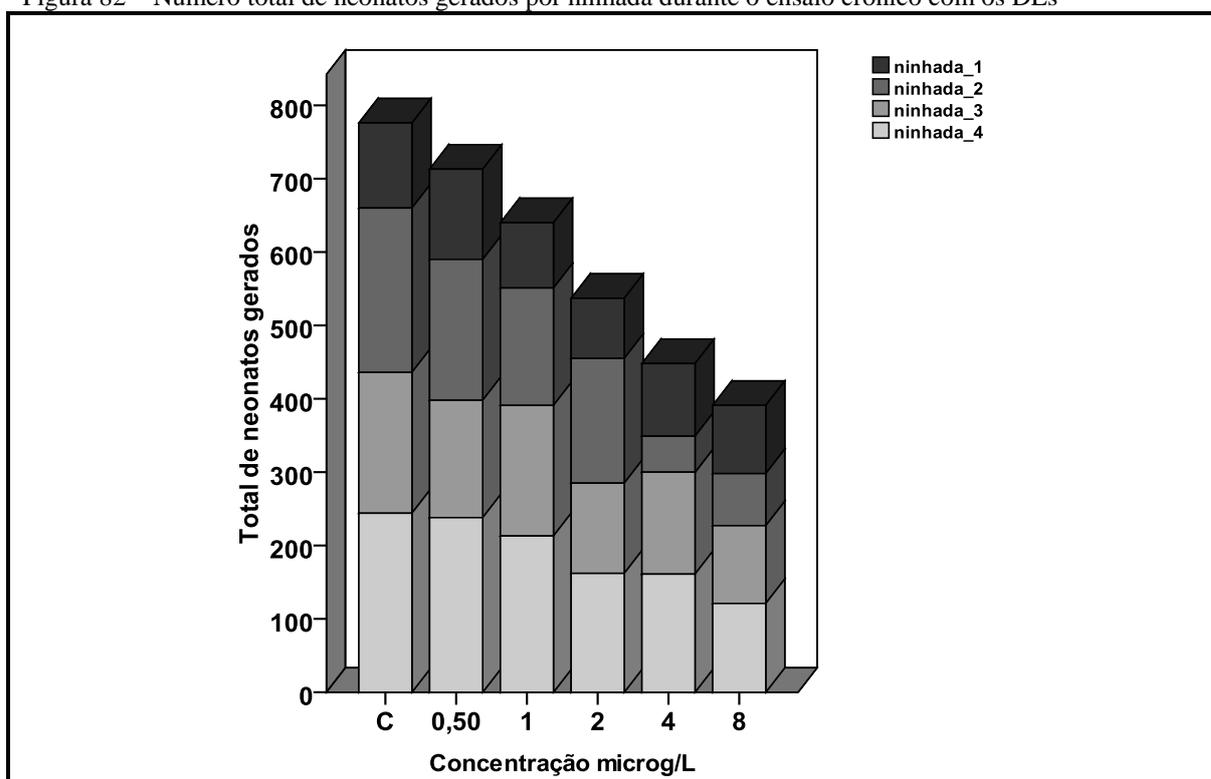
Nos resultados obtidos para a ETE: CNM não foi observado efeito crônico, ou seja, o número médio de neonatos gerados por organismo adulto no controle foi menor em relação às concentrações da amostra analisada, ou seja, o efluente não causou efeito tóxico na fecundidade. Tal comportamento foi, possivelmente, influenciado pela concentração elevada de algas verdes no efluente, tendo como um dos gêneros predominante *Chlorellas* (VON SPERLING, 2002). Há relatos do uso da alga clorofícea *Chlorella vulgaris* na alimentação da

D. magna (BARATA *et al.*, 2002). Beatrici (2004) e Moreira (2008) observaram que a concentração do alimento utilizado na dieta influencia diretamente na reprodução dos organismos. Além disso, a presença das algas pode ter alterado a resposta do organismo aos compostos tóxicos, possivelmente presentes modificando a toxicidade aparente do efluente ou o metabolismo do organismo (LANNON *et al.*, 1989).

Não foram analisadas gerações posteriores como foi descrito por Baer *et al.* (2009), os quais reportaram efeito crônicos ao longo das gerações na *D. magna*, tais como: mudança de sexo, alteração no abdômen da *Daphnia* impedindo sua reprodução e alteração na primeira antena do macho. Os efluentes analisados eram provenientes de estações de tratamento municipais e de lagoas aeradas. No entanto, os autores atribuíram o fato a compostos desconhecidos, uma vez que os mesmos não realizaram análises cromatográficas.

Na Figura 82 pode-se observar o número de organismos gerados por ninhada em cada concentração avaliada e no controle.

Figura 82 – Número total de neonatos gerados por ninhada durante o ensaio crônico com os DEs



Fonte: AUTORA. 2012

A taxa de reprodução apresentou uma diminuição significativa no ensaio com a solução multielementar dos DEs a partir da concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, embora seja considerada uma concentração elevada quando comparada com os dados de DEs reportados

nessa pesquisa. Como abordado, o ensaio crônico buscou apenas comprovar o efeito ao sistema endócrino dos organismos.

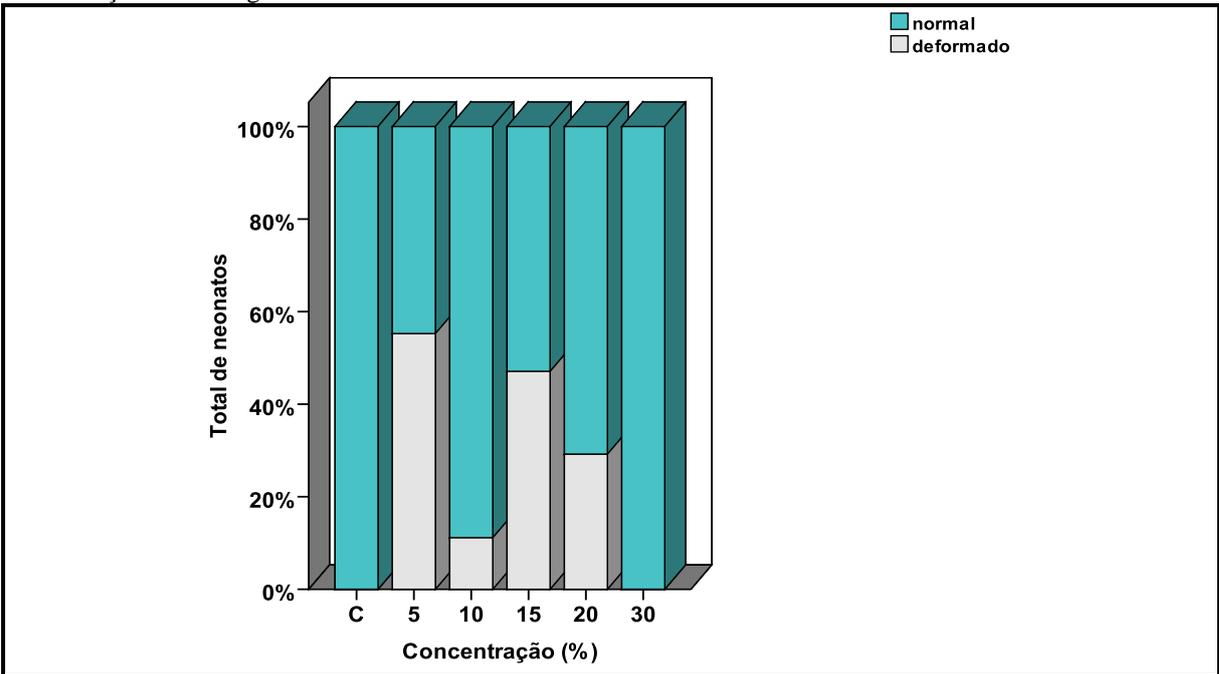
Barbosa *et al.* (2008) utilizaram concentrações ainda maiores dos hormônios endógenos masculinos testosterona e 4-hidroxiandrostenediona (estrutura semelhante a da estrona) e observaram efeitos na reprodução em concentrações de $0,84 \text{ mg L}^{-1}$.

O resultado obtido apresentando na Figura 82 difere do reportado por Clubbs e Brooks (2007), os quais obtiveram redução significativa da fecundidade apenas na 1ª e 2ª ninhada na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ do EE2. Tal diferença pode ser atribuída aos efeitos sinérgicos dos quatro DEs avaliados em conjunto na presente pesquisa, enquanto Clubbs e Brooks (2007) analisaram apenas o EE2. Tal hipótese corrobora com os pesquisadores Dietrich *et al.* (2010), os quais expuseram a *D. magna* aos compostos individuais e à mistura deles, sendo o EE2 mantido no nível $0.101 \pm 0.003 \text{ ng L}^{-1}$. No entanto, o efeito crônico na reprodução para a mistura foi maior quando comparada ao EE2 apenas na 1ª geração de *Daphnias*. A partir da 2ª geração, a mistura causava efeitos positivos de fecundidade. Vale ressaltar que futuras gerações não foram analisadas durante essa pesquisa, por isso que a hipótese para a 1ª geração torna-se válida.

Em termos de crescimento não foi observado nenhum efeito crônico das amostras citadas.

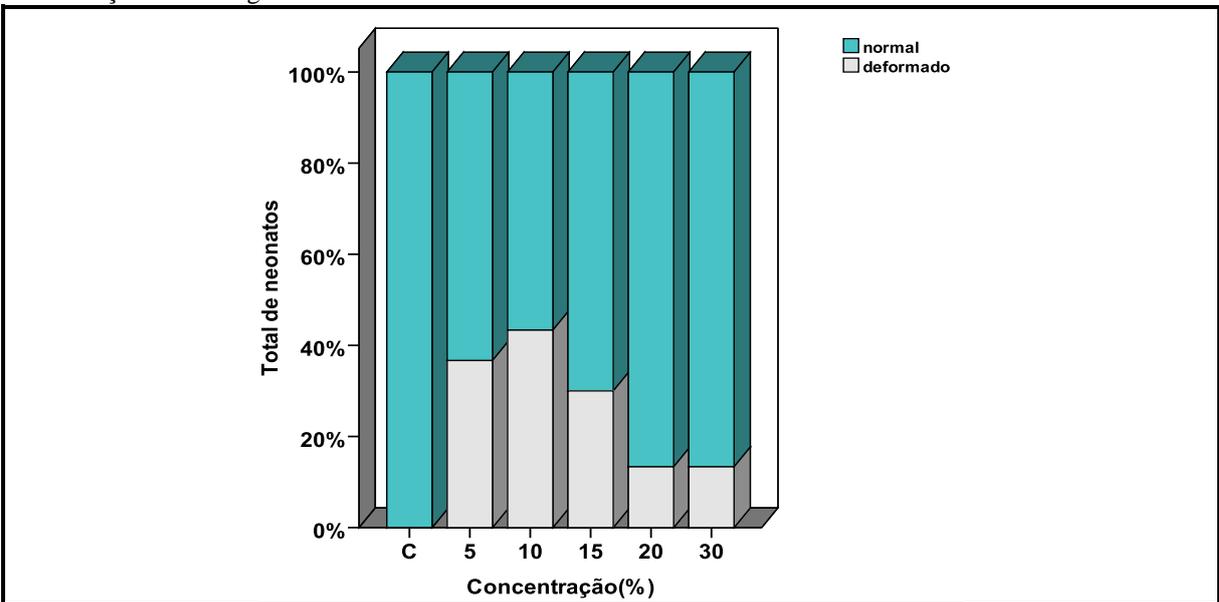
Os neonatos gerados nos ensaios crônicos foram avaliados em termos de deformações morfológicas, não sendo possível realizar testes estatísticos nos mesmos para comprovar o efeito crônico devido ao número de neonatos analisados não representarem a população de neonatos gerados durante os testes. Entretanto, foi avaliado 10% do total da população de neonatos. Os resultados obtidos durante os testes com o efluente da ETE CJW e CNM estão apresentados nas Figuras 83 e 84, respectivamente. Nos testes do efluente da ETE TB não foram observadas deformações. Os tipos de alterações morfológicas podem ser visualizados na Figura 85.

Figura 83 – Porcentagem do número de neonatos gerados no ensaio crônico da ETE:CJW em termos de deformações morfológicas



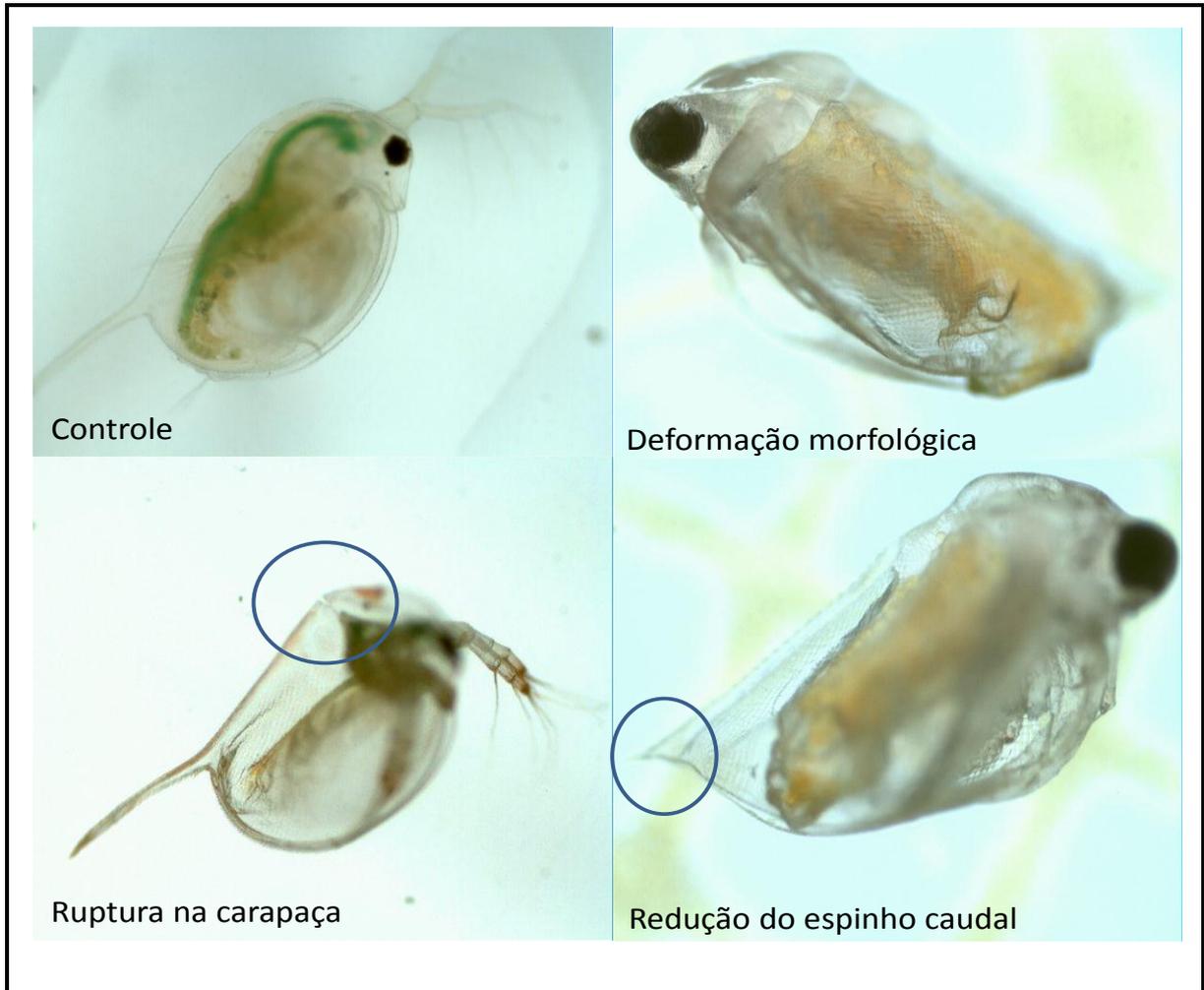
Fonte: AUTORA, 2012

Figura 84 – Porcentagem do número de neonatos gerados no ensaio crônico da ETE:CNM em termos de deformações morfológicas



Fonte: AUTORA, 2012

Figura 85 – Tipos de alterações morfológicas dos neonatos gerados ao longo dos ensaios crônicos com efluentes das ETEs: CJW e CNM



Fonte: AUTORA, 2012

As alterações morfológicas apresentadas são bastante semelhantes às reportadas por Zhang *et al.* (2003) ao exporem a *D. magna* ao DE nonilfenol (4 – NP). Além da deformação de neonatos serem atribuídas à presença de compostos classificados como desreguladores endócrinos nos efluentes analisados foram relatadas malformações causadas por cianobactérias, conhecidas por produzirem toxinas (SON DAO *et al.*, 2010). Provavelmente a presença da cianobactérias influenciaram os resultados obtidos, principalmente porque em várias lagoas de estabilização analisadas em Fortaleza a concentração de cianobactérias é bastante elevada (dado não publicado).

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento da metodologia analítica para a identificação e quantificação dos micropoluentes estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol-acetato, e colesterol em esgotos sanitários e águas superficiais utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS) foi realizada com êxito.

Com relação à etapa de otimização da derivatização, o reagente selecionado foi o BSTFA sem a presença do meio reacional, uma vez que os resultados obtidos comprovaram que a presença do meio reacional impedia a realização da reação. As demais condições da reação foram otimizadas com sucesso utilizando a ferramenta de planejamento fatorial.

A etapa de extração em fase sólida (SPE) dos analitos também foi aperfeiçoada em vários parâmetros através do planejamento experimental, conseguindo-se uma faixa aceitável de recuperação para os analitos estudados.

O método cromatográfico utilizado foi considerado validado, uma vez que os resultados de precisão, linearidade e recuperação foram satisfatórios quando comparado com valores estimados na literatura.

Com relação à avaliação de remoção dos DEs nas estações de tratamento de esgoto sanitário, as menores eficiências de remoção foram encontradas para os sistemas de baixa taxa (lagoas de estabilização) com 68,1% (LF+LM1); 79,9% (LF+LM2) e 54,0% (LF). Os sistemas de alta taxa obtiveram eficiências de remoção satisfatórias: 93,4% (LA+Cl); 95,4% (UASB+Cl). Para o CHOL o melhor índice de remoção foi obtido na ETE LF+LM2 com 94%, seguida das ETES LA+Cl (88%) e UASB+Cl (82%).

Os estrogênios naturais estrona e estradiol foram detectados nos rios Ceará e Cocó, além do micropoluente colesterol, indicando assim o elevado índice de contaminação por parte da comunidade ribeirinha e por descarte de efluentes sanitários próximos aos pontos de amostragem. Os valores máximos obtidos nas águas superficiais foram de: 212,75 ng L⁻¹ (E1); 256,25 ng L⁻¹ (E2) e 1175 ng L⁻¹ (CHOL). Os estrogênios sintéticos E2-17A e EE2 não foram detectados.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda as ETES utilizando a tecnologia de lagoas de estabilização apresentaram remoção eficiente dos compostos tóxicos aos organismos aquáticos, enquanto as ETES de lodos ativados e UASB, ambos seguidos da etapa de cloração apresentaram alto nível de contaminação em *Daphnia magna*.

Em relação ao ensaio de ecotoxicidade crônica em *Daphnia magna* pode-se concluir que apenas no efluente proveniente do tratamento de LF não foram observados efeitos crônicos de sobrevivência, reprodução e crescimento, no entanto no efluente foi evidenciado o parâmetro de deformações morfológicas em neonatos. Para as demais ETEs foram observados efeitos crônicos nos efluentes, podendo o lançamento destes gerar um risco potencial, em longo prazo, aos corpos receptores.

Os resultados obtidos nos ensaios crônicos realizados com os compostos-alvo dessa pesquisa evidenciaram a atividade estrogênica uma vez que tais substâncias causaram em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) redução de fecundidade, mudança de sexo e alterações morfológicas no bioindicador *Daphnia magna*.

7 RECOMENDAÇÕES

Complementar os estudos de derivatização utilizando piridina como catalisador da reação, assim como analisar o efeito do banho ultrassônico em relação ao banho-maria.

Este estudo contribuiu com a caracterização do esgoto sanitário no estado do Ceará quanto à presença de alguns desreguladores endócrinos e micropoluentes dissolvidos na fase líquida. Recomendam-se futuros trabalhos em que se determine um maior número de compostos, avalie a influência da sazonalidade nas concentrações desses micropoluentes no esgoto sanitário e quantifique os compostos sorvidos na biomassa dos sistemas de tratamento biológicos.

Monitorar os estrogênios conjugados nas ETEs, de forma a elucidar as rotas de degradação, além do estriol, o qual é considerado um subproduto da biodegradação.

Realizar estudos ecotoxicológicos multigeracional (ao longo das gerações) com o bioindicador *Daphnia magna*.

Utilizar outros bioindicadores, como peixes e algas, para que os efeitos dos desreguladores endócrinos sejam avaliados em três níveis tróficos.

REFERÊNCIAS

1. ABEGGLEN, C.; JOSS, A.; McARDELL, C.S.; FINK, G.; SCHLÜSENER, M.P.; TERNES, T.A; SIEGRIST, H. **The fate of selected micropollutants in a single-house MBR.** Water Research, v.43, p.2036-2046, 2009.
2. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera).** ABNT NBR 12713. 23f, 2009.
3. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*).** ABNT NBR 12648. 24f, 2005a.
4. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera).** ABNT NBR 13373. 15f, 2005b.
5. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Agrotóxicos e afins – Validação de métodos analíticos.** ABNT NBR 14029. 19f, 2005c.
6. AL-ANSARI, A.M., SALEEM, A., KIMPE, L.E., SHERRY, J.P., MCMASTER, M.E., TRUDEAU, V.L., BLAIS, J.M. **Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 α -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada.** Environmental Pollution, v.158, p. 2566–2571, 2010.
7. ALTMANN, D.; SCHAAR, H.; BARTEL, C.; SCHORKOPF, D.L.P.; MILLER, I.; KREUZINGER, N.; MÖSTL, E.; GRILLITSCH, B. **Impact of ozonation on ecotoxicity and endocrine activity of tertiary treated wastewater effluent.** Water Research, v.46, p.3693-3702, 2012.
8. ANDERSEN, H.R.; SIEGRIST, H.; HALLING- SØRENSEN, B; TERNES, T.A. **Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant.** Environmental Science & Technology, v. 37, n. 18, 2003.
9. ANDERSEN, H.R.; KJØLHOLT, J.; HANSEN, M.; STUER-LAURIDSEN, F.; BLICHER, T.D.; INGERSLEV, F.; HALLING- SØRENSEN, B. **Degradation of estrogens in sewage treatment process.** EPA, Denmark. 2004.
10. ANDERSEN, H.R.; HANSEN, M ; KJØLHOLT, J.; STUER-LAURIDSEN, F.; BLICHER, TERNES, T.; HALLING- SØRENSEN, B. **Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment.** Chemosphere, v.61, p.139-146, 2005.
11. ANDRÁSI, N.; HELENKÁR, A. ZÁRAY, G.; VASANITS, A.; MOLNÁR- PERL, I. **Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: Analysis of dissolved steroids in wastewater samples.** Journal of Chromatography A, v. 1218, p. 1878-1890, 2011.

12. AOAC - *Association of Official Analytical Chemists. Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures*, Arlington, VA. 1998.
13. ATKINSON, S.K.; MARLATT, V.L.; KIMPE, L.E.; LEAN, D.R.S., TRUDEAU, V.L.; BLAIS, J.M. **The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewatertreatment plants.** *Science of the Total Environment*, v. 430, p.119–125, 2012.
14. AZZOUZ, A.; SOUHAIL, B.; BALLESTEROS, E. **Continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples.** *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2956-2963, 2010.
15. BAER, K.N.; McCOOLE, M.D.; OVERTURF, M.D. **Modulations of sex ratios in *Daphnia magna* following multigenerational exposure to sewage treatment plant effluents.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 1545-1550, 2009.
16. BAIRD, D.J.; BARBER, I.; BRADLEY, M.; CALOW, P.; SOARES, A.M.V.M. **The *Daphnia* bioassay: a critique.** *Hydrobiologia*, v. 188/189, p. 403–406, 1989.
17. BARATA, C.; MARKICH, S.J.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V.M. **The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus.** *Aquatic Toxicology*, v. 61, p.143 – 154, 2002.
18. BARBOSA, I.R.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M. **Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p.757– 764, 2008.
19. BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. **Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving waters.** *Environmental Science & Technology*, v. 34, n. 24, p. 5059-5066, 2000.
20. BARRY, E.F.; GROB, R.L. **Columns for gas chromatography: performance and selection.** 1st Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. 313p.
21. BEATRICI, A.C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade da *Daphnia similis* e *Daphnia magna* (crustacea, cladocera) submetidas a diferentes tipo de dietas e meio de cultivo.** Porto Alegre, 2004, 46f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
22. BECK, M.; RADKE, M. **Determination of sterols, estrogens and inorganic ions in waste water and size-segregated aerosol particles emitted from waste water treatment.** *Chemosphere*, v. 64, p.1134-1140, 2006.
23. BENIJTS, T.; LAMBERT, W.; DE LEENHEER, A. **Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion Trap-MS/MS.** *Analytical Chemistry*, v. 76, p.704-711, 2004.

24. BHANDARI, A.; SURAMPALLI, R.; ADAMS, C.D.; CHAMPAGNE, P.; ONG, S.K.; TYAGI, R.D.; ZHANG, T.C. **Contaminants of Emerging Environmental Concern**. American Society of Civil Engineers (ASCE), 2009. ISBN 978-0-7844-1014-1
25. BIBBO, M., HAENSZEL, W.M., WIED, G.L., HUBBY, M., HERBST, A.L. **A twenty-five-year follow-up study of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy**. *New England Journal of Medicine*, v. 298, p. 763–67, 1978.
26. BICCHI, C.; SCHILIRÓ, T.; PIGNATA, C.; FEA, E.; CORDERO, C.; CANALE, F.; GILLI, G. **Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents**. *Science of Total Environment*, v.407, p. 1842-1851, 2009.
27. BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; VOELKEL, A. **Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents**. *Talanta*, v. 80, p.614-621, 2009.
28. BILA, D.M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -Estradiol pelo processo de ozonização**. Rio de Janeiro, 2005, 282f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
29. BILA, D.M. E DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**. *Química Nova*, v.30, n.3, p.651-666, 2007.
30. BIZKARGUENAGA, E.; ROS, A.; IPARRAGUIRRE, A.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; USOBIAGA, A.; ZULOAGA. **Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater**. *Journal of Chromatography A*, v. 1247, p.104– 117, 2012.
31. BORTOLINI, O.; MEDICI, A.; POLI, S. **Biotransformations on steroid nucleus of bile acids**. *Steroids*, v. 62, p.564-577, 1997.
32. BOWDEN, J.A.; COLOSI, D.M.; MORA-MONTERO, D.C.; GARRETT, T.J.; YOST, R.A. **Evaluation of derivatization strategies for the comprehensive analysis of endocrine disrupting compounds using CG/MS**. *Journal of Chromatographic Science*, v. 47, p. 44-51, 2009.
33. BOYD, G.R., REEMTSMA, H., GRIMM, D.A., MITRA, S. **Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada**. *The Science of the Total Environment*, v.311, p.135–149, 2003.
34. BRANDT, E.M.F. **Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (reatores UASB seguidos de pós-tratamento)**. Belo Horizonte, 2012. Dissertação (Curso de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

35. BRANDÃO, L.P. **Perspectivas do reuso de águas residuárias tratadas por lagoas de estabilização em irrigação no estado do Ceará.** Fortaleza, 2000. Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
36. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE nº899 de 29/05/2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.
37. BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução nº. 357/2005.** *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.* Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília, 2005.
38. BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução nº. 430/2011.** *Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.* Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília, 2011a.
39. BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria MS Nº 2914/2011.** *Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.* Ministério da Saúde, Brasília, 2011b.
40. BRAUN, P.; MOEDER, M.; SCHRADER, ST.; POPP, P.; KUSCHK, P.; ENGEWALD, W. **Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v.988, p. 41-51, 2003.
41. BREATICI, A.C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) submetidas a diferentes tipos de dietas e meios de cultivo.** 2004. 34f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
42. BRENTANO, D.M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** 2006, 129f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
43. CAGECE (Companhia de Água e Esgoto do Ceará). **Esgotamento Sanitário.** Disponível em: <<http://www.cagece.com.br/esgotamento-sanitario/tratamento>>. Acesso em: 07 Setembro 2012.
44. CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M.; LLOMPART, M.; GARCÍA-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GÓMEZ, M.; TERNES, T.; **Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant.** *Water Research*, v.38, p. 2918–2926, 2004.
45. CARBALLA, M.; OMIL, F.; TERNES, T.; LEMA, J.M. **Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge.** *Water Research*, v. 41, p. 2139-2150, 2007.

46. CARLSEN, E., GIWERCMAN, A., KEIDING, N., SKAKKEBAEK, N.E. **Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years.** *BMJ*, v. 305, p. 609–613, 1992.
47. CARNEIRO, P.M. **Remoção de BTEX em biorreatores anaeróbios sob condições metanogênicas, desnitrificantes e sulfetogênicas.** 2012, 130f. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
48. CASTRO, M.D.L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. **The role of ultrasound in analytical derivatizations.** *Journal of Chromatography B*, v. 879, p. 1189-1195, 2011.
49. CAVALCANTE, C.M.; ANDRADE, M.V.F.; MARINS, R.V.; OLIVEIRA, L.D.M. **Development of a headspace-gas chromatography (HS-GC-PID-FID) method for the determination of VOCs in environmental aqueous matrices: Optimization, verification and elimination of matrix effect and VOC distribution on the Fortaleza Coast, Brazil.** *Microchemical Journal*, v. 96, p. 337-343, 2010.
50. CEC - COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Communication from the commission to the council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife.** Brussels, 2001.
51. CHANG, E.S.; BRUCE, M.J.; TAMONE, S.L. **Regulation of Crustacean Molting: A Multi-Hormonal System.** *American Zoologist*, v. 33(3), p.324-329, 1993.
52. CHANG, H.; WAN, Y.; WU, S.; FAN, Z.; HU, J. **Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens.** *Water Research*, v. 45, p.732-740, 2011.
53. CHOWDHURY, R.R.; CHARPENTIER, P.A.; RAY, M.B. **Photodegradation of 17 β -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 219, p.67-75, 2011.
54. CHOWDHURY, R.R.; CHARPENTIER, P.A.; RAY, M.B. **Photodegradation of estrone in solar irradiation.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 49, n.15, p.6923-6930, 2010.
55. CLARKE, O.B.; SMITH, S.R. **Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids.** *Environment International*, v. 37, p.226-247, 2011.
56. CLUBBS, R.L.; BROOKS, B.W. ***Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 67, p.385–398, 2007.
57. COLEMAN, H. M., EGGINS, B. R., BYRNE, J. A., PALMER, F. L. & KING, E. **Photocatalytic degradation of 17 β -oestradiol on immobilised TiO₂.** *Applied Catalysis B Environmental*, v. 24, 1–5, 2000.

58. COLEMAN, H. M., ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P., EGGINS, B. R. & BYRNE, J. A. **Rapid loss of estrogenicity of steroid estrogens by UVA photolysis and photocatalysis over an immobilised titanium dioxide catalyst.** *Water Research*, v. 38, n.14–15, p. 3233–3240, 2004.
59. COLEMAN, H. M., ABDULLAH, M. I., EGGINS, B. R. & PALMER, F. L. **Photocatalytic degradation of 17 β -oestradiol, oestriol and 17 α -ethinyloestradiol in water monitored using fluorescence spectroscopy.** *Applied Catalysis B Environmental*, v. 55, p. 23–30, 2005
60. COLEMAN, H.M.; LE-MINH, N.; KHAN, S.J.; SHORT, M.D.; CHERNICHARO, C.; STUETZ, R.M. **Fate and levels of steroid oestrogens and androgens in waste stabilization ponds: quantification by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Water Science & Technology*, v. 61, n. 3, p. 677-684, 2010.
61. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia.** 1ªed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006, 453p.
62. COOMBE, R.G.; TSONG, Y.Y.; HAMILTON, P.B.; SIH, C.J. **Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. X. Oxidative cleavage of estrona.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 241, n. 7, p.1587-1595, 1966.
63. COSTA, C.R.; OLIVI, P. BOTTA, C.M.R.; ESPÍNDOLA, E.L.G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação.** *Química Nova*, v. 31, n.7, p. 1820-1830, 2008.
64. CRAIN D.A.; JANSSEN S.J.; EDWARDS T.M.; HEINDEL J.; HO S.; HUNT P.; *et al.* **Female reproductive disorders: the role of endocrine-disrupting compounds and developmental timing.** *Fertility Sterility*, v. 90, p. 911-940, 2008.
65. CUNHA, A.C.B. **Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de fármacos e pesticidas em amostras aquosas ambientais.** 2005. 93f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
66. CZAJKA, C.P.; LONDRY, K.L. **Anaerobic biotransformation of estrogens.** *Science of the Total Environment*, v. 367, p. 932-941, 2006.
67. D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. **Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities.** *The Science of the Total Environment*, v. 302, p.199–209, 2003.
68. DAMÁSIO, J.; TAULER, R.; TEIXIDÓ, E.; RIERADEVALL, M.; PRAT, N.; RIVA, M.C.; SOARES, A. M.V.M.; BARATA, C. **Combined use of *Daphnia magna* in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain).** *Aquatic Toxicology*, v. 87, p. 310-320, 2008.

69. DANG, Z.; CHENG, Y.; CHEN, H.; CUI, Y.; YIN, H.; TRASS, T.; MONTFORTS, M.; VERMEIRE, T. **Evaluation of the *Daphnia magna* reproduction test for detecting endocrine disruptors.** Chemosphere, v. 88, p.514-523, 2012.
70. DEAN, J.R. **Extraction Methods for Environmental Analysis.** 1st Ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1998, 225p.
71. DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. **Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature.** International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 214, p.442– 448, 2011.
72. DEBORDE, M.; RABOUAN, S.; GALLARD, H.; LEGUBE, B. **Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors.** Environmental Science Technology, v. 38, p. 5577-5583, 2004.
73. De GRAAFF, M.S.; VIENO, N.M.; KUJAWA-ROELEVELD, K.; ZEEMAN, G.; TEMMINK, H.; BUISMAN, C.J.N. **Fate of hormones and pharmaceuticals during combined anaerobic treatment and nitrogen removal by nitrification-anammox in vacuum collected black water.** Water Research, v.45, p.375-383, 2011.
74. De MES, T.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. **Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -etiniestradiol in STPs for domestic wastewater.** Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, v.4, p. 275-311, 2005.
75. De MES, T.Z.D. **Fate of estrogens in biological treatment of concentrated black water.** 2007. 154p. PhD Thesis (Socio-Economic and Natural Sciences of the Environment) - Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, 2007.
76. De MES, T.; KUJAWA-ROELEVELD, K.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. **Anaerobic biodegradation of estrogens – Hard to digest.** Water Science & Technology, v.57, n.8, p.1177-1182, 2008.
77. DÍAZ-CRUZ, M.S.; GARCÍA-GALAN, M.J.; GUERRA, P.; JELIC A.; POSTIGO C.; ELJARRAT, E.; FARRÉ, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; PETROVIC, M.; BARCELÓ. **Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge.** Trends in Analytical Chemistry, v.28, n.11, p.1263-1275, 2009.
78. DIETRICH, S.; PLOESSL, F.; BRACHER, F.; LAFORSCH, C. **Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study.** Chemosphere, v. 79, p. 60-66, 2010.
79. DIN - DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 38412:** testverfahren mit Wasserorganismen (gruppeL) Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen. 1989.
80. DUARTE, P.A.F. **Novos Poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública.** 2008, 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Centro de Ciências e Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

81. DYTCHAK, M.A., LONDRY, K.L., OLESZKIEWICZ, J.A. **Biotransformation of estrogens in nitrifying activated sludge under aerobic and alternating anoxic/aerobic conditions.** *Water Environmental Research*, v. 80, p.47–52, 2008.
82. ECKERT, R.; RANDALL, D. J.; BURGGREN, W. W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações.** Rio de Janeiro, 729 p. ISBN 978-85-277-0594-3, 4ª Ed, 2008.
83. EERTMANS F., DHOOGHE W., STUYVAERT S., COMHAIRE F. **Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment.** *Toxicology in Vitro*, v. 17, p. 515-524, 2003.
84. ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. **Morphological abnormalities in the Cladoceran *Ilyocryptus spinifer* (Apipucos Reservoir, Pernambuco State, Brazil).** *Brazilian Journal of Biology*, v.64, n.1, p. 53-58, 2004.
85. EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J-M.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. **Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater.** *Environmental International*, v. 30, p.891-900, 2004.
86. FAHRBACH, M. **Anaerobic degradation of steroid hormones by novel denitrifying bacteria.** PhD thesis, RWTH Aachen University, Germany, 2006.
87. FERNANDEZ, M.P.; IKONOMOU, M.G.; BUCHANAN, I. **An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian waters.** *Science Total Environmental*, v. 373, p.250–69, 2007.
88. FIELD, A. **Descobrimos a estatística usando o SPSS.** 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 688p.
89. FROEHNER, S.; PICCIONI, W.; MACHADO, K.S.; AISSE, M.M. **Removal Capacity of Caffeine, Hormones, and Bisphenol by Aerobic and Anaerobic Sewage Treatment.** *Water, Air & Soil Pollution*, v. 216, p.463–471, 2011.
90. 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. 201-216, 2008.
91. GABET, V.; MIÈGE, C.; BADOS, P.; COQUERY, M. **Analysis of estrogens in environmental matrices.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.26, n.11, p.1113- 1131, 2007.
92. GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; LACHANCE, B.; SUNAHARA, G.I.; SABIK, H. **Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*.** *Environmental Pollution*, v.115, p.97-106, 2001.

93. GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006,181f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
94. GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. **Interferentes endócrinos no ambiente**. Química Nova, v.30, n.3, p.695-706, 2007.
95. GIROTTO, G.; NOGUEIRA, K.L.; MOURA, J.A.; SOUZA, J.B.; GIACOMETTI, L.L.; MARCHI, M.R.R.; TOGNOLLI, J.O. **Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas**. Eclética Química, v.32, n.2, p.61-67, 2007.
96. GOMES, R.L; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. **Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters**. Trends in Analytical Chemistry, v. 22; n. 10, p.697-707, 2003.
97. GOMEZ, E.; WANG, X.; DAGNINO, S.; LECLERCQ, M.; ESCANDE,A.; CASELLAS, C.; B. PICOT, B.; FENET, H. **Fate of endocrine disrupters in waste stabilization pond systems**. Water Science & Technology, v. 55,n.11,p. 155-163, 2007.
98. GONÇALVES, R.S.L.; FREIRE, G.S.S.; NETO, V.A.N. **Determinação das concentrações de cádmio, cobre, cromo e zinco, na ostra *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Cocó e Ceará**. Revista de Geologia, v. 20, n.1, p. 57-63, 2007.
99. GOTO, T.; HIROMI, J. **Toxicity of 17a-ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, with special reference to their synergetic effect**. Marine Pollution Bulletin, v. 47, p.139–142, 2003.
100. GRANADOS, Y. P.; BÁEZ, M. C. D.; RONCO,A.; SOBRERO, C.; ROSSINI, G. B.; FEOLA, G.;FORGET, G.; SANCHES-BAIN, A. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. México: Editora Gabriela Castillo Morales. 2004. 189 p. ISBN 968-5536-33-3.
101. GUILHERMINO, L.; DIAMANTINO, T.; CAROLINA SILVA, M.; SOARES, AMVM. **Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity?** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 46(3), p.357-362, 2000.
102. GUPTA C. **Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals**. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 224(2), p. 61-68, 2000.
103. HAEBBA, M.H; HILSCHEROVÁ, K.; MAZUROVÁ, E.; BLÁHA, L. **Selected Endocrine Disrupting Compounds (Vinclozolin, Flutamide, Ketoconazole and Dicofol): Effects on Survival, Occurrence of Males, Growth, Molting and Reproduction of *Daphnia magna***. Environmental Science Pollutant Research, v. 15, n.3, p. 222 – 227, 2008.

104. HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. **Review: Derivatization in mass spectrometry – 1. Silylation.** *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 9 (1), p. 1-21, 2003.
105. HARRIES, J.E.; JANBAKSH, A.; JOBLING, S.; MATTHIESSEN, P.; SUMPTER, J.P.; TYLER, C.R. **Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 18, n. 5; p.932-937, 1999.
106. HARDER, J.; PROBIAN, C. **Anaerobic mineralization of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium.** *Arch Microbiol*, v. 167, p. 269-274, 1997.
107. HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M.; GÓMEZ, M.J.; MALATO, O.; AGUERA, A.; FERNANDÉZ-ALBA, A.R. **Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters.** *Journal of Chromatography A*, V.1047, p. 129–135, 2004.
108. HERNANDO, M.D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; TAULER, R.; BARCELÓ, D. **Toxicity assays applied to wastewater treatment.** *Talanta*, v. 65, p. 358-366, 2005.
109. HERNÁNDEZ, F.; PORTOLÉS, T.; PITARCH, E.; LÓPEZ, F.J. **Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 2, p. 388-400, 2011.
110. HESS-WILSON J.K; KNUDSEN K.E. **Endocrine disrupting compounds and prostate cancer.** *Cancer Letters*, v. 241, p. 1-12, 2006.
111. HINTEMANN, T.; SCHNEIDER, C.; SCHÖLER, H.F.; SCHNEIDER, R.J. **Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment.** *Water Research*, v.40, p.2287 – 2294, 2006.
112. HOPE, B.K.; STONE, D.; FUJI, T.; GENSEMER, R.W.; JENKINS, J. **Meeting the challenge of identifying persistent pollutants at the state level.** *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 6, n.4, p.735-748, 2010.
113. HOPE, B.K.; PILLSBURY, L.; BOLING, B. **A state-wide survey in Oregon (USA) of trace metals and organic chemicals in municipal effluent.** *Science of the Total Environment*, v. 417-418, p.263-272, 2012.
114. HOSIE, S., LOFF, S., WITT, K., NIESSEN, K., WAAG, K.L. **Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes?** *European Journal Pediatric Surgery*, v. 10, p. 304-309, 2000.
115. HOTCHKISS, A., RIDER C.V.; BLYSTONE, C.R.; WILSON, V.S. HARTIG, P.C.; ANKLEY, G.T.; FOSTER, P.M. GRAY, C.L; GRAY, L.E. **Fifteen Years after “Wingspread”—Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go.** *Toxicological Sciences*, v. 105(2), p.235–259, 2008.

116. HU, J.; CHENG, S.; AIZAWA, T.; TERAQ, Y.; KUNIKANE, S. **Products of aqueous chlorination of 17 β -Estradiol and their estrogenic activities.** Environmental Science & Technology, v. 37, p. 5665-5670, 2003.
117. HUANG, B.; XUE-JUN, P.; JING-LIANG, L.; KAI, F.; YU, W.; JIAN-PEI, G. **Hydroxyl group derivatization of steroid environmental endocrine disrupting chemicals.** Chinese Journal of Analytical Chemistry, v. 37, n.11, 1651-1656, 2009.
118. HUANG, M-H.; LI, Y-M.; GU, G-W. **Chemical composition of organic matters in domestic wastewater.** Desalination, v. 262, p. 36-42, 2010.
119. HUANG, B.; XUE-JUN, P.; XING, W.; JING-LIANG, L.; SHI-MIN, Z.; PING, H.; FA-RONG, LI. **Hydroxyl group derivatization of steroid environmental endocrine disrupting chemicals.** Chinese Journal of Analytical Chemistry, v. 39, n.4, 449-454, 2011.
120. HUBER, L. **Validation and qualification in analytical laboratories.** 2th Ed. Waldbronn: Informa Healthcare, 2007. 303p.
121. HUCK, C.W.; BONN, G.K. **Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction.** Journal of Chromatography A, v. 885, p. 51-72, 2000.
122. HUTCHINSON, T.H. **Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches.** Toxicology Letters, v. 131, p.75-81, 2002.
123. IBAMA- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. **Manual do IBAMA- Parte D. Avaliação da toxicidade de agentes químicos para micro-organismos, microcrustáceos, peixes, algas, organismos do solo, aves animais silvestres e plantas.** Rio de Janeiro, Ministério do Meio Ambiente, 1987.
124. IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.** Rio de Janeiro, 2010. ISBN 978-85-240-4135-8.
125. INGRAND, V.; HERRY, G.; BEAUSSE, J.; ROUBIN, M. **Analysis of steroid in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1020, P. 99-104, 2003.
126. INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). **Estações Automáticas – Gráficos.** Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf>. Acesso em: 23 agosto 2012.
127. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Documento orientativo DOQ-CGCRE-008. 2006.
128. INOUE, K.; KUBOTA, S.; SEYAMA, Y. **Cholesterol induces apoptosis of cerebellar neuronal cells.** Biochemical Biophys Research Commun, v. 256, p.198-203, 1999.

129. JEANNEAU, L.; FARUE, P.; JARDÉ, E. **Influence of natural organic matter on the solid-phase extraction of organic micropollutants Application to the water-extract from highly contaminated river sediment.** Journal of Chromatography A, v.1173, p. 1-9, 2007.
130. JIANG, W. YAN, Y.; MA, M.; WANG, D.; LUO, Q.; WANG, Z.; SATYANARAYANAN, S.K. **Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China.** Journal of Environmental Sciences, v.24, n.2, p.320-328, 2012.
131. JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. **Widespread sexual disruption in wild fish.** Environmental Science & Technology, v. 32, p. 2498-2506, 1998.
132. JOBLING, S.; COEY,S.; WHITMORE, J.G.; KIME, D.E.; VAN LOOK, K.J.W.; McALLISTER, B.G.; BERESFORD, N.; HENSHAW, A.C.; BRIGHTY, G.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J. P. **Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility.** Biology of Reproduction, v. 67, p. 515-524, 2002.
133. JOHNSON A.C.; BELFROID A., Di CORCIA A. **Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent.** The Science of the Total Environment, v.256, p.163–173, 2000.
134. JOHNSON A.C.; SUMPTER J.P. **Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works.** Environmental Science & Technology, v. 35, p.4697–4703, 2001.
135. JONES P.D.; COEN WMDE, TREMBLAY L.; GIESY J.P. **Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens.** Water Science Technology, v.42, p. 1–14, 2000.
136. JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T.; RICHLER, P.R.; SIEGRIST, H. **Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization.** Environmental Science Technology, v.38, p. 3047-3055, 2004.
137. JURGENS, M.; HOLTHAUS, K.I.E.; JOHNSON, A.C.; SMITH, J.J.L.; HETHERIDGE, M.; WILLIAMS, R. **The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 21, n.3, p. 480-488, 2002.
138. KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M.; GUWY, A.J. **The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters.** Water Research, v. 43, p.363-380, 2009.
139. KVANLI, D. M.; MARISSETY, S.; ANDERSON, T.A.; JACKSON, A.W.; MORSE, A.N. **Monitoring Estrogen Compounds in Wastewater Recycling Systems.** Water Air Soil Pollution, v.188, p. 31-40, 2008.

140. KELLY, C. **Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography – mass spectrometry and gas chromatography – tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 872, p.309-314, 2000.
141. KIM, B.C., PARK, K.S., KIM, S.D., GU, M.B. **Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a *Daphnia magna* bioassay.** Biosensors and Bioelectronics, v.18, p.821-826, 2003.
142. KIM, S.D; CHO, J.; KIM, I.S.; VANDERFORD, B.J.; SNYDER, S.A. **Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking and wastewaters.** Water Research, v.41, p. 1013-1021, 2007.
143. KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações.** Florianopolis: FATMA/ GTZ, 2004. 289 p.
144. KOH, Y.K.K.; CHIU, T.Y.; BOOBIS,A.; CARTMELL, E.; LESTER, J.N.; SCRIMSHAW, M.D. **Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v.1173, p.81, 2007.
145. KUSHNIR, M.M.; ROCKWOOD,A.L.; ROBERTS,W.L.; YUE, B. ; BERGQUIST,J.; A.W. MEIKLE. **Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories.** Clinical Biochemistry, v.44, p. 77, 2011.
146. KUSTER, M.; AZEVEDO, D.A.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; AQUINO NETO, F.R.; BARCELÓ, D. **Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil).** Environment International, v. 35, p. 997-1003, 2009.
147. KWON, J.H.; LILJESTRAND, H.M.; KATZ, L.E. **Partitioning of moderately hydrophobic endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25, n. 8, p. 1984–1992, 2006.
148. LABADIE, P.; BUDZINSKI, H. **Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Éysines River (near Bordeaux, France).** Environmental Science & Technology, v. 39, n°14, p.5113-5120, 2005.
149. LABADIE, P.; HILL,E.M. **Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1141, p. 174, 2007.
150. LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; DE LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. **Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters.** Analytica Chimica Acta, v. 501, p. 79-88, 2004.
151. LAI, KM.; JOHNSON, K.L.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. **Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems.** Environmental Science & Technology, v. 34, p.3890-3894, 2000.

152. LAI, K.M.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. **Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems.** Science Total Environmental, v.289, p.159–68, 2002.
153. LAITANO, K.S.; MATIAS, W.G. **Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB.** Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 1, n.1, p.43-47, 2006.
154. LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos: Rima, 2004. 62p.
155. LANNO, R.P.; HICKIE, B.E.; DIXON, D.G. **Feeding and nutritional considerations in aquatic toxicology.** Hydrobiologia, v. 188/189, p. 525-531, 1989.
156. LEE, H.B.; LIU, D. **Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria.** Water, Air and Soil Pollution, v. 134, p. 353-368, 2002.
157. LEE, B-C.; KAMATA, M.; AKATSUKA, Y.; TAKEDA, M.; OHNO, K.; KAMEI, T.; MAGARA, Y. **Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals.** Water Research, v.38, p. 733-739, 2004.
158. LEECH, D.M.; SNYDER, M.T.; WETZEL, R.G. **Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 β -estradiol in water.** Science of the Total Environment, v. 407, p.2087-2092, 2009.
159. LEITE, G. D. S.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F. **Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução.** Química Nova, v. 33, n.3, p. 734-738, 2010.
160. LERCH, O.; ZINN, P. **Derivatisation and gas chromatography – chemical ionization mass spectrometry of selected synthetic and natural endocrine disruptive chemicals.** Journal of Chromatography A, v. 991, p. 77-97, 2003.
161. LEUSCH, F.D.L.; CHAPMAN, H.F.; VAN DEN HEUVEL, M.R.; TAN, B.L.L.; GOONERATNE, S.R.; TREMBLAY, L.A. **Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 65, p. 40-4011, 2006.
162. LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. **Endocrine disruptors in the environment – IUPAC Technical Report.** Pure Applied Chemistry, v. 75, nº5, p. 631-681, 2003.
163. LIN, A. Y.-C.; REINHARD, M. **Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water.** Environmental Toxicology and Chemistry, v.24, p.1303–1309, 2005.

164. LISHMAN, L.; SMYTH, S.A.; SARAFIN, K., KLEYWEGT, S.; TOITO, J.; PEART, T.; LEE, B.; SERVOS, M.; BELAND, M.; SETO, P. **Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada.** *Science of the Total Environment*, v. 367, p. 544-558, 2006.
165. LIU, B E LIU, X. **Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions.** *Science of the Total Environmental*, v. 320, p. 269-274, 2004.
166. LIU, R.; ZHOU, J.L; WILDING, A. **Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1022, p. 179-189, 2004a.
167. LIU, R.; ZHOU, J.L; WILDING, A. **Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments.** *Journal of Chromatography A*, v. 1038, p. 19-26, 2004b.
168. LOPES, L.G.; MARCHI, M.R.R.; SOUZA, J.B.G.; MOURA, J.A.; LORENZON, C.S.; CRUZ, C.; AMARAL, L.A. **Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo.** *Química Nova*, v.33, nº3, p. 639-643, 2010.
169. LOPEZ DE ALDA,M.J.; BARCELÓ, D. **Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 892, p.391-406, 2000.
170. LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e Aplicações.** São Carlos. Editora Rima. 2006. 588p. ISBN 85 7656 113 1.
171. MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** *Oecologia Brasiliensis*, v.12, p.355-381, 2008.
172. MAGEE, B.R.; LION, L.W.; LEMLEY, A.T. **Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phnenanthrene in porous media.** *Environmental Science & Technology*, v. 25 (2), p. 323-331, 1991.
173. MAGI, E.; SCAPOLLA, C.; Di CARRO, M.; LISCIO, C. **Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry*, v. 45, p. 1003-1011, 2010.
174. MAGIERA, S.; UHLSCHMIED, C.; RAINER, M.; HUCK, C.W.; BARANOWSKA, I.; BONN, G.K. **GC-MS method for the simultaneous determination of β – blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.56, p.93-102, 2011.
175. MASQUÉ, N.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F. **New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 17, n.06, p.384-394, 1998.

176. MATSUI, S.; TAKIGAMI, H.; MATSUDA, T.; TANIGUCHI, N.; ADACHI, J.; KAWAMI, H.; SHIMIZU, Y. **Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment.** *Water Science & Technology*, v. 42, n 12, p. 173–179, 2000.
177. MAYER, M.L.; POOLE, S.W.; POOLE, C.F. **Retention characteristics of octadecylsiloxane-bonded silica and porous polymer particle-loaded membranes for solid-phase extraction.** *Journal of Chromatography A*, v. 697, p.89-99, 1995.
178. McKENNA, P.; MORGAN, S.J.; BOSANQUET, R.C.; LAKER, M.F. **A case of cerebrotendinous xanthomatosis. II: the sterol content of a cataractous lens.** *Br. J. Ophthalmol*, v. 74, p.629-630, 1990.
179. McNAIR, H.M.; MILLER, J.M. **Basic gas chromatography.** 2th Ed., Hoboken: John Wiley & Sons, 2009, 239p.
180. MEIERAN, S.E.; REUS, V.I.; WEBSTER, R.; SHAFTON, R.; WOLKOWITZ, O.M. **Chronic pregnenolone effects in normal humans: attenuation of benzodiazepine-induced sedation.** *Psychoneuroendocrinology*, v. 29, p.486–500, 2004.
181. MENDONÇA, E.; PICADO, A.; PAIXÃO, S.M.; SILVA, L.; CUNHA, M.A.; LEITÃO, S.; MOURA, I.; CORTEZ, C.; BRITO, F. **Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal.** *Journal of Hazardous Materials*, v.163, p. 665-670, 2009.
182. MIÈGE, C.; KAROLAK, S.; GABET, V.; JUGAN, M.-L.; OZIOL, L.; CHEVREUIL, M.; LEVI, Y.; COQUERY, M. **Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.28, n.2, p.186-195, 2009.
183. METCALF, L.; EDDY, H. P. **Wasterwater engeneering: Treatment, disposal reuse.** McGraw Hill, 4 ed., 2003,1819p.
184. MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry.** 5th ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2005.268p.
185. MOL, H.G.J.; SUNARTO, S.; STEIJGER, O.M. **Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N – methyl – N- (tert – butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection.** *Journal of Chromatography A*, v. 879, p. 97-112, 2000.
186. MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNANDEZ, R.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPINS-FALCÓ, P. **Improving analysis of apolar organic compounds by the use of a capillary titania-based column: Application to the direct determination of faecal sterols cholesterol and coprostanol in wastewater samples.** *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p.4682-4687, 2010.
187. MONTEIRO, S.P.P.B. **Desenvolvimento e aplicação de teste de toxicidade aguda utilizando como organismo-teste *Daphnia magna*.** 2009, 83f. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2009.

188. MOSCHET, C. **Microbial degradation of steroid hormones in the environment and technical systems**. Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics, 2009.
189. MOREIRA, D.S. **Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte**. 2008, 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2008.
190. MOREIRA, M.; AQUINO, S.; COUNTRIN, M.; SILVA, J.; AFONSO, R. **Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS)**. *Environmental Technology*, v.32, n.12, 1409-1417, 2011.
191. MORIYAMA, K.; MATSUFUJI, H.; CHINO, M.; TAKEDA, M. **Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol**. *Chemosphere*, v. 55, p.839-847, 2004.
192. MULLER, M.; RABENOELINA, F.; BALAGUER, P.; PATUREAU, D.; LEMENACH, K.; BUDZINSKI, H.; BARCELÓ, D.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; KUSTER, M.; DELGENÈS, J.P.; HERNANDEZ-RAQUET, G. **Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in a advanced sewage treatment plant**, *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, p.1649 – 1658, 2008.
193. NOPPE, H. **Analytics of endocrine disrupting chemicals in environmental matrices**. 2006, 188p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universiteit Gent, Salisburylaan, Merelbeke, 2006.
194. NIETO, R. **Caracterização ecotoxicológica de efluentes líquidos industriais – ferramenta para ações de controle da poluição das águas**. *Anais 17º Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2000.
195. NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. **Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. *Journal of Chromatography A*, v.1213, p.224-230, 2008.
196. NIVEN, S.J.; SNAPE, J.; HETHERIDGE, M.; EVANS, M.; MCEVOY, J.; ROWLANDA, S.J. **Investigations of cholesterol transformation during sewage treatment: relevance to estrogen formation pathways?** *The Science of the Total Environment*, v. 279, p.75-86, 2001.
197. OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. **Endocrine disruption in invertebrates**. *Pure and Applied Chemistry*, v. 75, n.11–12, p. 2207–2218, 2003.
198. OLMSTEAD, A.W.; LeBLANC, G.A. **Effects of endocrine-active chemicals on the Development of sex characteristics of *Daphnia magna***. *Environmental Toxicology Chemistry*, v.19, p.2107–2113, 2000.

199. OLSEN, G.W.; BODNER, K.M.; RAMLOW, J.M.; ROSS, C.E.; LIPSHULTZ, L.I. **Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited.** *Fertility Sterility*, v.63 (4), p.887–893, 1995.
200. PAL, A.; GIN, K.Y-H.; LIN, A. Y-C.; REINHARD, M. **Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects.** *Science of the Total Environment*, v.408, p.6062-6069, 2010.
201. PANDA, S.K.; CHATTORAJ, S.C.; BROITMAN, S.A. **Correlation of neomycin, faecal neutral and acid sterols with colon carcinogenesis in rats.** *British Journal of Cancer*, v. 80, p.1132-1136, 1999.
202. PATERAKIS, N.; CHIU, T.Y.; KOH, Y.K.K.; LESTER, J.N.; McADAM, E.J.; SCRIMSHAW, M.D.; SOARES, A.; CARTMELL, E. **The effectiveness of anaerobic digestion in removing estrogens and nonylphenol ethoxylates.** *Journal of Hazardous Materials*, v.199-200, p.88-95, 2012.
203. PATROLECCO, L.; CAPRI, S.; DE ANGELIS, POLESELLO, S.; VALSECCHI, S. **Determination of endocrine disrupting chemicals in environmental solid matrices by extraction with a non-ionic surfactant (Tween 80).** *Journal of Chromatography*, v. 1022, p. 1-7, 2004.
204. PEDROUZO, M.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. **Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry.** *Talanta*, v. 78, p. 1327-1331, 2009.
205. PLÓSZ, B.G.; LEKNES, H.; LILTVED, H.; THOMAS, K.V. **Diurnal variations in the occurrence and the fate of hormones and antibiotics in activated sludge wastewater treatment in Oslo, Norway.** *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 1915-1924, 2010.
206. PURDOM, C.E.; HARDIMAN, P.A.; BYE, V.V.J.; ENO, N.C.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. **Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works.** *Chemistry and Ecology*, v. 8, p. 275-285, 1994.
207. QUEIROZ, F.B. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.** 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2011.
208. QUINTANA, J.B.; CARPINTEIRO, J.; RODRIGUEZ, I.; LORENZO, R.A.; CARRO, A.M.; CELA, R. **Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection.** *Journal of Chromatography A*, v. 1024, p. 177-185, 2004.
209. RA, J.S.; OH, S.; LEE, B.C.; KIM, S.D. **The effect of suspended particles coated by humic acid on the toxicity of pharmaceuticals, estrogens, and phenolic compounds.** *Environment International*, v. 34, 184–192, 2008.

210. REIS FILHO, R.W.; ARAUJO, J.C.; VIEIRA, E.M. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** Química Nova, v. 29, n°4, p.817-822, 2006.
211. REN, Y.; NAKANO, K.; NOMURA, M.; CHIBA, N.; NISHIMURA, O. **A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process.** Water Research, v. 41, p. 2341-2348, 2007a.
212. REN, Y.-X., NAKANO, K., NOMURA, M., CHIBA, N., NISHIMURA, O. **Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge.** Water Research, v. 41, 3089–3096, 2007b.
213. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B. G; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, v.27, n°5, p.771-780, 2004.
214. RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos.** 2ªed., Campinas: Cárita Editora, 2009.358p.
215. RODRÍGUEZ, E.M; MEDESANI, D.A.; FINGERMAN, M. **Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 146, p.661–671, 2007.
216. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. **Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1045, p. 85-92, 2004.
217. RODRIGUEZ-PINILLA, E.; WEBER-SCHÖNDORFER, C. Hormones. **Drugs During Pregnancy and Lactation.** 2ª ed. Londres: Elsevier. cap. 2, p. 381-422, 2007.
218. ROGERS, H. R. **Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges.** Science of The Total Environment, v. 185, p.3- 26, 1996.
219. ROH, H.; CHU, K-H. **Effects of solids retention time on the performance of bioreactors bioaugmented with a 17 β – estradiol utilizing bacterium, *Sphingomonas* strain KC8.** Chemosphere, v. 84, p. 227-233, 2011.
220. RUTHERFORD, B. **The synthetic chemical threat-endocrine disruptors.** Pesticides News, n°31, p.6-7, 1996.
221. SAHAR, E.; DAVID, I.; GELMAN, Y.; CHIKUREL, H.; AHARONI, A.; MESSALEM, R.; BRENNER, A. **The use of RO to remove emerging pollutants following CAS/UF or MBR treatment of municipal wastewater.** Desalination, v. 273, p.142-147, 2011.
222. SALES, J.W.F. **Análise multivariada aplicada na qualidade de água dos principais sistemas lacustres da bacia hidrográfica do rio Cocó, Fortaleza-CE.** 2010, 86f. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

223. SALVADOR, A.; MORETTON, C.; PIRAM, A.; FAURE, R. **On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants.** *Journal of Chromatography A*, v.1145, p.102-109, 2007.
224. SANCHEZ, D.C.O. **Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos.** 2006, 55f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
225. SANTOS, E.P.C.C. **Remoção de etinilestradiol no tratamento de água para consumo humano: estudo em escala piloto.** 2011, 169f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio-Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
226. SCHÄFER, A.I.; AKANYETI, I.; SEMIÃO, A.J.C. **Micropollutant sorption to membrane polymers: A review of mechanisms for estrogens.** *Advances in Colloid and Interface Science*, v.164, p.100–117, 2011.
227. SCHLÜSENER, M.P.; BESTER, K. **Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilizing high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization.** *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 19, p. 3269-3278, 2005.
228. SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B.M.R. WENNING, R.; MILLET, M. **Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to CG/MS analysis.** *Talanta*, v. 77, p. 1473-1482, 2009.
229. SEBÖK, Á; SEZER, K.; VASANITS-ZSIGRAI, A.; HELENKÁR, A.; ZÁRAY, G.; MÓLNAR-PERL, I. **Gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment.** *Journal of Chromatography A*, v.1211, p. 104-112, 2008.
230. SEGNER, H.; CAROLL, K.; FENSKE, M.; JANSSEN, C.R.; MAACK, G.; PASCOE, D.; SCHAFERS, C.; VANDENBERGH, G.F.; WATTS, M.; WENZEL, A. **Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 54, p.302–314, 2003.
231. SERVOS, M.R.; BENNIE, D.T.; BURNISON, B.K.; JURKOVIC, A.; MCINNIS, R.; NEHELI, T.; SCHNELL, A.; SETO, P.; SMYTH, S.A.; TERNES, T.A. **Distribution of estrogens, 17 α -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants.** *Science of the Total Environment*, v. 336, p.155– 170, 2005.
232. SHAREEF A., PARNIS C.J., ANGOVE M.J., WELLS J.D.; JOHNSON B.B. **Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyl)dimethylsilyl) – N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 [alpha]-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1026, p. 295-300, 2004.

233. SHAREEF, A.; ANGOVE, M.J.; WELLS, J.D. **Optimization of silylation using N-methyl – N – (trimethylsilyl) – trifluoroacetamide, N,O – bis – (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butildimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography – mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v.1108, p.121-128, 2006.
234. SHI, J., FUJISAWA, S., NAKAI, S., HOSOMI, M. **Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*.** Water Research, v. 38, p. 2323–2330, 2004.
235. SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. **Gas Chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids.** Journal of Chromatography A, v. 935, p.141-172, 2001.
236. SILVA, R.F.M.; RODRIGUES, C.M.P.; BRITES, D. **Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid.** Journal of Hepatology, v. 34, p. 402-408, 2001.
237. SILVA, C.G.A.; COLLINS, C. H. **Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes.** Química Nova, v. 34, n^o4, p. 665-676, 2011.
238. SIM, W.J.; LEE, J.W.; SHIN, S.K.; SONG, K.B.; OH, J.E. **Assessment of fates of estrogens in wastewater and sludge from various types of wastewater treatment plants.** Chemosphere, v.82, n^o10, p.1448-1453, 2011.
239. SNYDER, L.R. **Principles of adsorption chromatography.** Marcel Dekker: New York, 1986.
240. 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 & Soil Pollution, v.206, p.57-67, 2010.
241. SON DAO, T.; DO-HONG, L-C.; WIEGAND, C. **Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring.** Toxicon, v. 55, p. 1244-1254, 2010.
242. SOUZA, N.C. **Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais.** 2011, 183f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
243. STILLMAN, R.J. **In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring.** American Journal of Obstetrics & Gynecology, v. 142, n.7, 905-921, 1982.
244. STRECK, G. **Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment.** Trends in Analytical Chemistry, v.28, n.6, p. 635-652.

245. STEVENS-GARMON, J.; JÖRG, E. ; DREWES A.; STUART J.; KHAN B.; JAMES A.; MCDONALD, B.; ERIC R.; DICKENSON, V. **Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids.** *Water Research*, v.45, n.11, p.3417-3426, 2011.
246. SUIDAN, M.T.; ESPERANZA, M.; McCAULEY, P.; BRENNER, R.C.; VENOSA, A.D. **Challenges in biodegradation of trace organic contaminants — gasoline oxygenates and sex hormones.** *Water Environmental Research*, v. 77, n.1, p.4-11, 2005.
247. SUSUKI, T.; MARUYAMA, T. **Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge.** *Water Research*, v. 40, p.1061-1069, 2006.
248. SVENSON, A., ALLARD, A. S., & MATS, E. **Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants.** *Water Research*, v.37, n.18, p. 4433–4443, 2003.
249. SWAN, S.H., ELKIN, E.P., FENSTER, L. **Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data.** *Environmental Health Perspective*, v.105, p.1228–1232, 1997.
250. SWAN S.H., MAIN K.M., F. LIU, STEWART S.L., KRUSE R.L., CALAFAT A.M., *et al.*, **Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure.** *Environmental Health Perspectives*, v.113, n.8, p. 1056–1061, 2005.
251. TAN, B.L.L.; HAWKER, D.W.; MÜLLER, J.F.; LEUSCH, F.D.L.; TREMBLAY, L.A.; CHAPMAN, H.F. **Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia.** *Environment International*, v. 33, p.654-669, 2007.
252. TAVARES, L.H.S.; ROCHA, O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** 1ªed. São Carlos: Rima, 2003.
253. TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R-D; SERVOS, M. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.** *The Science of the Total Environmental*, v. 225, p.81-90, 1999a.
254. TERNES, T.A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge.** *The Science of the Total Environmental*, v. 225, p.91-99, 1999b.
255. TERNES, T.A.; ANDERSEN, H.; GILBERG, D.; BONERZ, M. **Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction an CG/MS/MS.** *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 3498-3504, 2002.
256. TERNES, T.A.; JOSS, A. **Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances – The challenge of micro pollutants in urban water management.** London-Seattle: IWA Publishing, 2006, 453p.

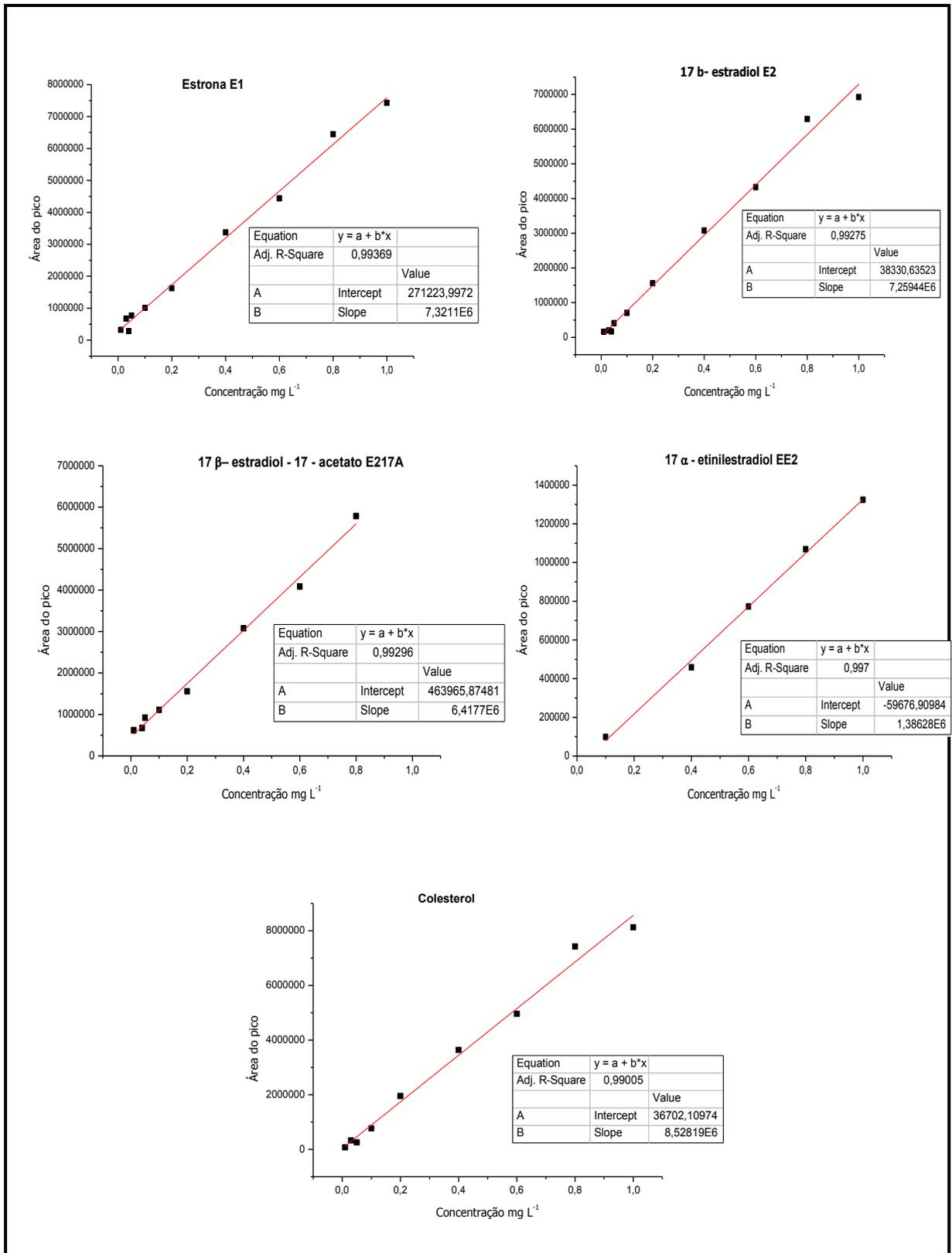
257. THORPE, K.L.; MAACK, G.; BENSTEAD, R.; TYLER, C.R. **Estrogenic wastewater treatment works effluents reduce egg production in fish.** Environmental Science & Technology, v. 43, n.8, p. 2976-2982, 2009.
258. TOMSÍKOVÁ,H.; AUFARTOVÁ, J.; SOLICH,P.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ,J.J; NOVÁKOVA, L. **High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples.** Trends in Analytical Chemistry, v. 34, p.35-58, 2012.
259. TON, S-S.; CHANG, S-H.; HSU, L-Y.; WANG, M-H.; WANG, K-S. **Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay.** Environmental Pollution, v.168, p.54-61, 2012.
260. TOURAUD, E.; ROIG, B.; SUMPTER, J.P.; COETSIER, C. **Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans?** International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 214, p.437– 441, 2011.
261. TRENHOLM, R.A.; VANDERFORD, B.J.; HOLADY, J.C.; REXING, D.J.; SNYDER, S.A. **Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry.** Chemosphere, v. 65, p. 1990-1998, 2006.
262. TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística.** 10^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 726 p.
263. USEPA, **Report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis.** Report n° EPA/630/R-96/012, Washington, DC, 1997.
264. USEPA. **Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS.** U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 2007.
265. USEPA, **Targeted National Sewage Sludge Survey Statistical Analysis Report.** United States Environmental Protection Agency Office of Water. Report n° EPA-822-R-08-018. Washington, DC, 2009.
266. VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. **Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A,17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS.** Journal of Hazardous Materials, v.183, p. 701-711, 2010.
267. VENKATESAN, M. I.; MIRSADEGHI, F. H. **Coprostanol as sewage tracer in McMurdo Sound, Antarctica.** Marine Pollution Bulletin, v.25, p.328-333, 1992.
268. VERLICCHI, P.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. **Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options.** Journal of Hydrology, v. 389, p. 416-428, 2010.
269. VERBINNEN, R.T.; NUNES, G.S. **Determinação de hormônios estrogênicos em água potável usando CLAE-DAD.** Química Nova, v. 33, n.9, p. 1837-1842, 2010.

270. VIENO, N.M., TUHKANEN, T., KRONBERG, L. **Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water.** *Environmental Science & Technology*, v. 39, p. 8220–8226, 2005.
271. VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lagoas de Estabilização.** Belo Horizonte: UFMG, 2002. 196p. ISBN: 85-85266-06-6.
272. VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lodos Ativados.** Belo Horizonte: UFMG, 2002. 428p. ISBN: 85-7041-129-4.
273. WAALKES M.P., ANVER M.R., DIWAN B.A. **Chronic toxic and carcinogenic effects of oral cadmium in the Noble (NBL/Cr) rat: induction of neoplastic and proliferative lesions of the adrenal, kidney, prostate, and testes.** *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, v. 58 (4), p.199–214, 1999.
274. WANG, Y., HU, W., CAO, Z., FU, X., e ZHU, T. **Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.383, p.857–863, 2005.
275. WATKINSON, A. J., MURBYC, E. J., COSTANZO, S. D. **Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling.** *Water Research*, v. 41, p. 4164 – 4176, 2007.
276. WEBER, S.; LEUSCHNER, P.; KÄMPFER, P.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. **Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, p.106–112, 2005.
277. WEIDNER, I.S., MØLLER, H., JENSEN, T.K., SKAKKEBAEK, N.E. **Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers.** *Environmental Health Perspectives*, v.106, p. 793–796, 1998.
278. WEST, C.C.; HARWELL, J.H. **Surfactants and subsurface remediation.** *Environmental Science & Technology*, v.26, n.12, 1992.
279. WILLIAMS, M.; WOODS, M.; KUMAR, A.; YING, G. G.; SHAREEF, A.; KARKKAINEN, M.; KOOKANA, R. **Endocrine disrupting chemicals in the Australian riverine environment: a pilot study on estrogenic compounds.** Australian Government Land & Water Australia and CSIRO, Braddon, Australian, 89p, 2007.
280. WHO -World Health Organization. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.** 2002.
281. WU, J.; HU, R.; YUE, J.; YANG, Z.; ZHANG, L. **Study on the derivatization process using *n*-*o*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, *n*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*n* methyltrifluoroacetamide, trimethylsilyldiazomethane for the determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry.** *Proceedings Of World Academy Of Science, Engineering And Technology*, v.34, 443-446, 2008.

282. YEOH, C. SCHERCK, C.B.; FEIST, G.W.; FITZPATRICK, M.S. **Endogenous steroid metabolism is indicated by fluctuations of endogenous steroid and steroid glucuronide levels in early development of the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *General and Comparative Endocrinology*, v. 103, p. 107-114, 1996.
283. YI, T.W., HARPER, W.F., HOLBROOK, R.D., LOVE, N.G. **Role of particle size and ammonium oxidation in removal of 17 alpha-ethinyl estradiol in bioreactors**. *Journal of Environmental Engineering-ASCE*, v.132, p. 1527-1529, 2006.
284. YI, T.W.; MACKINTOSH, S.; AGA, D.S.; HARPER, W.F. **Exploring 17 α -ethinylestradiol removal, mineralization, and bioincorporation in engineered bioreactors**. *Water Research*, v. 45, p.1369-1377, 2011.
285. YING, G.; KOOKANA, R.S.; DILLON, P. **Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material**. *Water Research*, v. 37, p.3785–3791, 2003.
286. YING, G. KOOKANA, R.S.; KUMAR, A. **Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, n. 1, p.87-94, 2008.
287. YU, C.-P., AHUJA, R., SAYLER, G., CHU, K.H. **Quantitative molecular assay for fingerprinting microbial communities of wastewater and estrogen-degrading consortia**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1433–1444, 2005.
288. ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2^a ed., São Carlos: RiMA, 2008. 472p.
289. ZENG, Y.; FU, X.; REN, Z. **The Effects of Residual Chlorine on the Behavioural Responses of *Daphnia magna* in the Early Warning of Drinking Water Accidental Events**. *Procedia Environmental Sciences*, v. 13, p. 71-79, 2012.
290. ZHANG, L.; GIBBLE, R.; BAER, K.N. **The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna***. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.55, p.330-337, 2003.
291. ZHANG, Z.L.; HIBBERD, A.; ZHOU, J.L. **Optimization of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography–mass spectrometry**. *Analytica Chimica Acta*, v.577, p.52-61, 2006.
292. ZHANG, Y. & ZHOU, J.L. **Occurrence and removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater**. *Chemosphere*, v. 73, n.5, p.848-853, 2008.
293. ZHOU, Y.-Q.; WANG, Z.-J., JIA, N. **Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 α -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination**. *Journal of Environmental Sciences*, v.19 (7), p. 879-884, 2007.

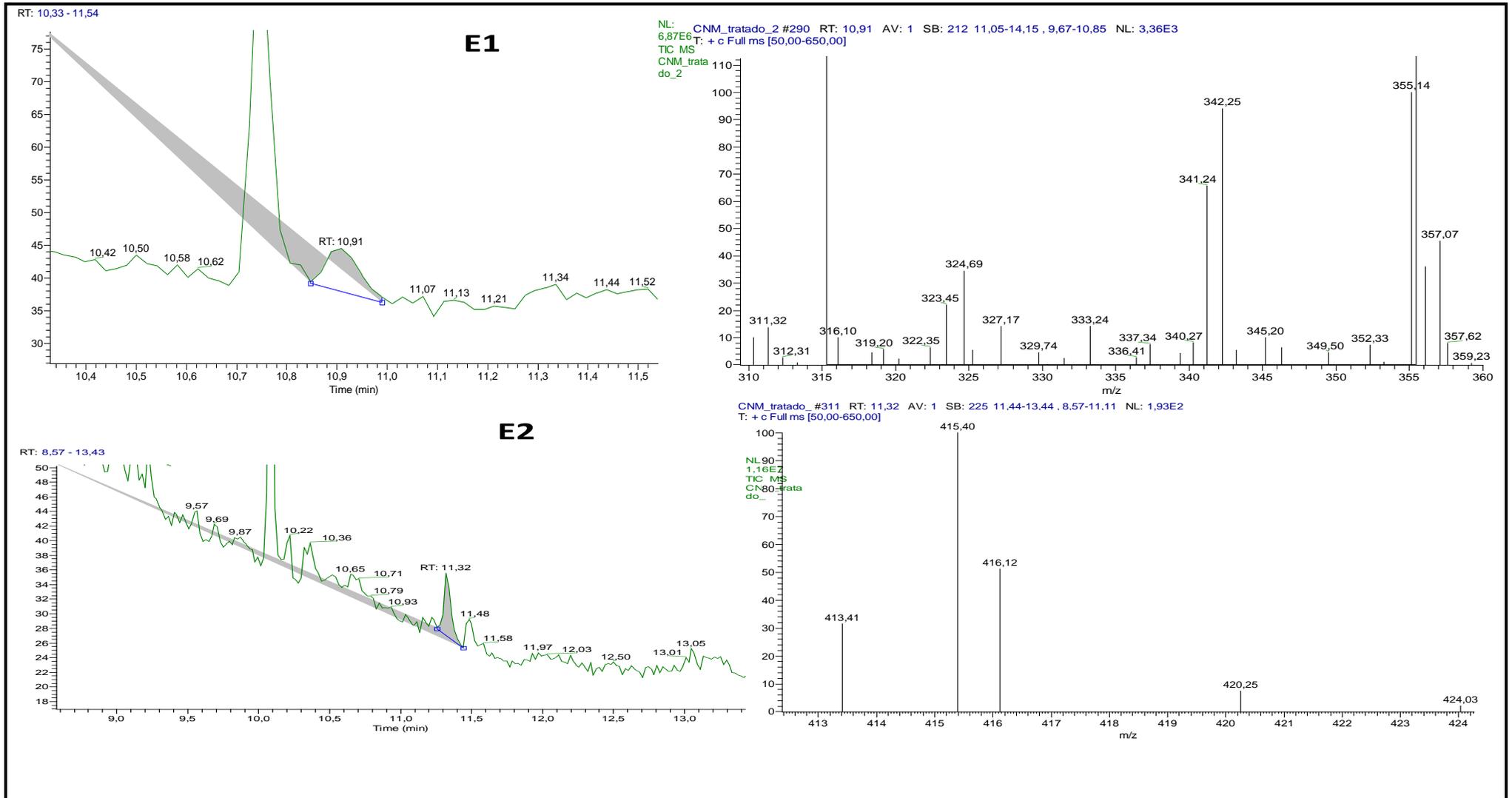
294. ZOU, E.; FINGERMAN, M. **Synthetic estrogenic agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit molting of the cladoceran *Daphnia magna*.** Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, v. 58, p.596-602, 1997.
295. ZUO, Y.G.; ZHANG K. **Suitability of N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide as derivatization reagent for the determination of the estrogens estrone and 17 alpha-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1095, 201-204, 2005.
296. ZUO, Y.G.; ZHANG K.; DENG, Y.W. **Occurrence and photochemical degradation of 17 α - ethinylestradiol in Acushnet River Estuary.** Chemosphere, v.63, p.1583–1590, 2006.

APÊNDICE A – Curvas analíticas obtidas durante a calibração externa dos hormônios



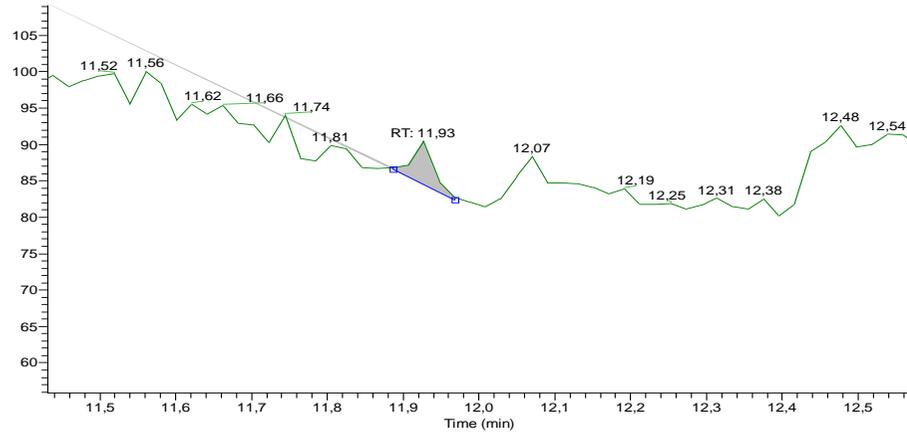
Fonte: AUTORA, 2012

APÊNDICE B – Espectros de massa dos DEs e do micropoluente em esgotos sanitários



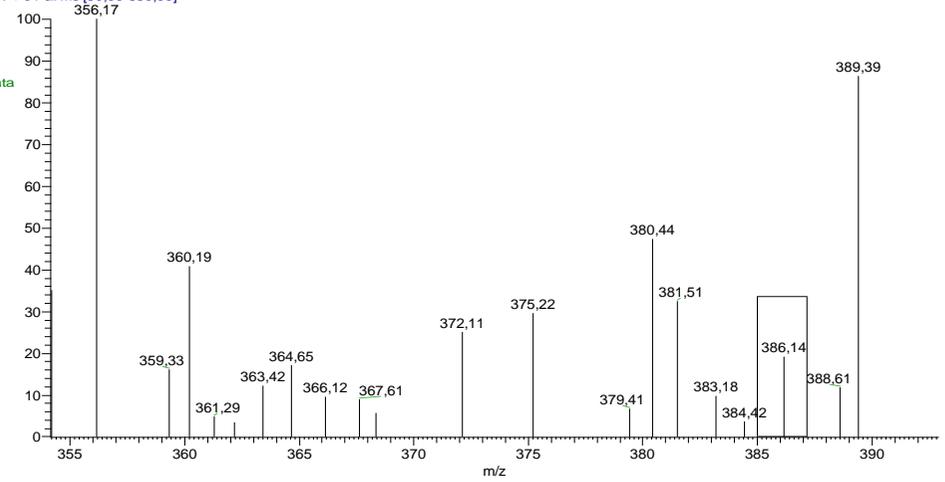
E2-17A

RT: 11.43 - 12.57



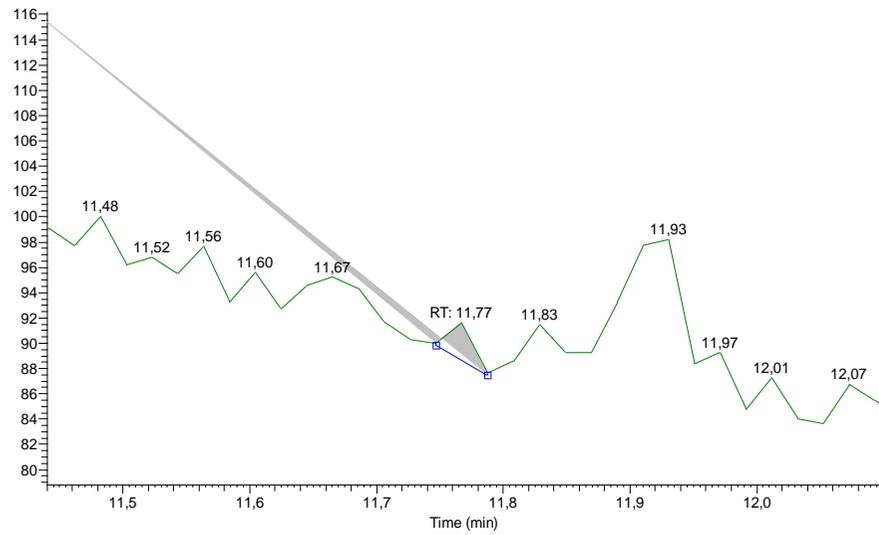
CNM_tratado_2 #340 RT: 11,93 AV: 1 SB: 51 12,03-12,58 , 11,44-11,89 NL: 7,20E2
T: + c Full ms [50,00-650,00]

NL:
2,64E6
TIC MS
CNM_trata
do_2



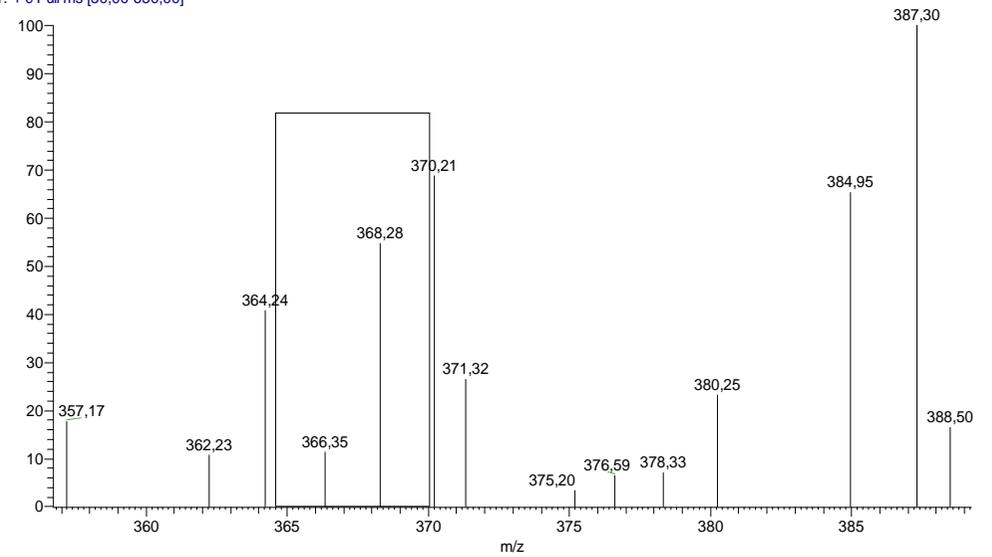
EE2

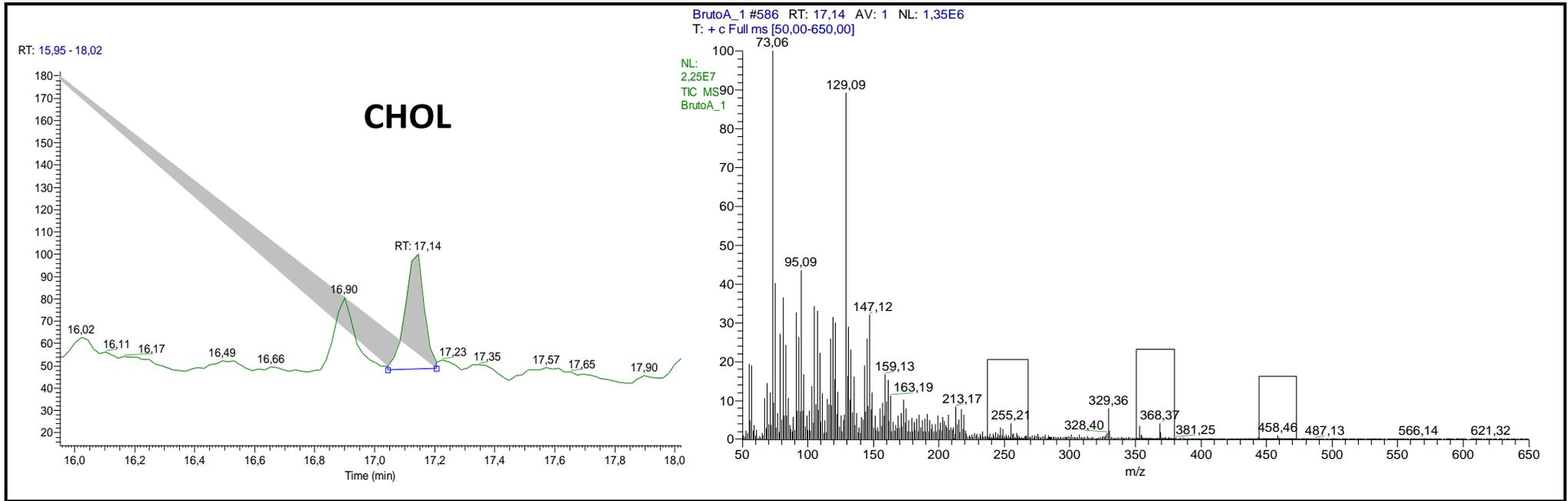
RT: 11.44 - 12.10



CNM_tratado3 #333 RT: 11,77 AV: 1 SB: 31 11,79-12,09 , 11,44-11,73 NL: 5,92E2
T: + c Full ms [50,00-650,00]

NL:
4,61E6
TIC MS
CNM_trata
do3





Fonte: AUTORA, 2012

APÊNDICE C – Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L⁻¹)	Vazão
E1	CJW	350	AFLUENTE
E1	CJW	262	AFLUENTE
E1	CJW	69	AFLUENTE
E1	CJW	< LD	AFLUENTE
E1	CJW	< LD	AFLUENTE
E1	CJW	< LD	EFLUENTE
E1	CJW	120	EFLUENTE
E1	CJW	48	EFLUENTE
E1	CJW	4	EFLUENTE
E1	CJW	< LD	EFLUENTE
E2	CJW	180	AFLUENTE
E2	CJW	210	AFLUENTE
E2	CJW	30	AFLUENTE
E2	CJW	< LD	AFLUENTE
E2	CJW	< LD	AFLUENTE
E2	CJW	< LD	EFLUENTE
E2	CJW	99	EFLUENTE
E2	CJW	3	EFLUENTE
E2	CJW	< LD	EFLUENTE
E2	CJW	< LD	EFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	AFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	AFLUENTE
E2-17A	CJW	7	AFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	AFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	AFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E2-17A	CJW	< LD	EFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	EFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	EFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	EFLUENTE
E2-17A	CJW	< LD	EFLUENTE
EE2	CJW	900	AFLUENTE
EE2	CJW	160	AFLUENTE
EE2	CJW	550	AFLUENTE
EE2	CJW	87	AFLUENTE
EE2	CJW	97	AFLUENTE
EE2	CJW	840	EFLUENTE
EE2	CJW	80	EFLUENTE
EE2	CJW	500	EFLUENTE
EE2	CJW	83	EFLUENTE
EE2	CJW	84	EFLUENTE
CHOL	CJW	< LD	AFLUENTE
CHOL	CJW	300	AFLUENTE
CHOL	CJW	164	AFLUENTE
CHOL	CJW	5	AFLUENTE
CHOL	CJW	4,75	AFLUENTE
CHOL	CJW	370	EFLUENTE
CHOL	CJW	370	EFLUENTE
CHOL	CJW	< LD	EFLUENTE
CHOL	CJW	4,7	EFLUENTE
CHOL	CJW	9,47	EFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E1	TB	560	AFLUENTE
E1	TB	1000	AFLUENTE
E1	TB	711	AFLUENTE
E1	TB	845	AFLUENTE
E1	TB	239	AFLUENTE
E1	TB	< LD	EFLUENTE
E1	TB	2080	EFLUENTE
E1	TB	1181	EFLUENTE
E1	TB	390	EFLUENTE
E1	TB	< LD	EFLUENTE
E2	TB	< LQ	AFLUENTE
E2	TB	500	AFLUENTE
E2	TB	384	AFLUENTE
E2	TB	482	AFLUENTE
E2	TB	15	AFLUENTE
E2	TB	< LQ	EFLUENTE
E2	TB	140	EFLUENTE
E2	TB	< LQ	EFLUENTE
E2	TB	125	EFLUENTE
E2	TB	< LQ	EFLUENTE
E2-17A	TB	1060	AFLUENTE
E2-17A	TB	2300	AFLUENTE
E2-17A	TB	< LD	AFLUENTE
E2-17A	TB	< LD	AFLUENTE
E2-17A	TB	150	AFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E2-17A	TB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	TB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	TB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	TB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	TB	< LD	EFLUENTE
EE2	TB	< LD	AFLUENTE
EE2	TB	< LD	AFLUENTE
EE2	TB	< LD	AFLUENTE
EE2	TB	< LD	AFLUENTE
EE2	TB	< LD	AFLUENTE
EE2	TB	< LD	EFLUENTE
EE2	TB	< LD	EFLUENTE
EE2	TB	385	EFLUENTE
EE2	TB	< LD	EFLUENTE
EE2	TB	< LD	EFLUENTE
CHOL	TB	8270	AFLUENTE
CHOL	TB	< LD	AFLUENTE
CHOL	TB	8908,12	AFLUENTE
CHOL	TB	6453,5	AFLUENTE
CHOL	TB	2713,5	AFLUENTE
CHOL	TB	< LD	EFLUENTE
CHOL	TB	640	EFLUENTE
CHOL	TB	310	EFLUENTE
CHOL	TB	59	EFLUENTE
CHOL	TB	37	EFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E1	CNM	< LD	AFLUENTE
E1	CNM	3050	AFLUENTE
E1	CNM	770	AFLUENTE
E1	CNM	17	AFLUENTE
E1	CNM	972	AFLUENTE
E1	CNM	280	EFLUENTE
E1	CNM	< LD	EFLUENTE
E1	CNM	192	EFLUENTE
E1	CNM	13	EFLUENTE
E1	CNM	529	EFLUENTE
E2	CNM	300	AFLUENTE
E2	CNM	< LD	AFLUENTE
E2	CNM	< LD	AFLUENTE
E2	CNM	284	AFLUENTE
E2	CNM	80	AFLUENTE
E2	CNM	< LD	EFLUENTE
E2	CNM	190	EFLUENTE
E2	CNM	< LD	EFLUENTE
E2	CNM	< LD	EFLUENTE
E2	CNM	12	EFLUENTE
E2-17A	CNM	1730	AFLUENTE
E2-17A	CNM	< LD	AFLUENTE
E2-17A	CNM	< LD	AFLUENTE
E2-17A	CNM	73	AFLUENTE
E2-17A	CNM	786	AFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E2-17A	CNM	1250	EFLUENTE
E2-17A	CNM	< LD	EFLUENTE
E2-17A	CNM	< LD	EFLUENTE
E2-17A	CNM	72	EFLUENTE
E2-17A	CNM	391	EFLUENTE
EE2	CNM	1380	AFLUENTE
EE2	CNM	< LD	AFLUENTE
EE2	CNM	180	AFLUENTE
EE2	CNM	627	AFLUENTE
EE2	CNM	< LD	AFLUENTE
EE2	CNM	100	EFLUENTE
EE2	CNM	< LD	EFLUENTE
EE2	CNM	300	EFLUENTE
EE2	CNM	272	EFLUENTE
EE2	CNM	<LD	EFLUENTE
CHOL	CNM	35200	AFLUENTE
CHOL	CNM	14280	AFLUENTE
CHOL	CNM	4220	AFLUENTE
CHOL	CNM	48,26	AFLUENTE
CHOL	CNM	135	AFLUENTE
CHOL	CNM	3000	EFLUENTE
CHOL	CNM	2900	EFLUENTE
CHOL	CNM	78	EFLUENTE
CHOL	CNM	35	EFLUENTE
CHOL	CNM	94	EFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E1	LA	< LD	AFLUENTE
E1	LA	1500	AFLUENTE
E1	LA	1513	AFLUENTE
E1	LA	47	AFLUENTE
E1	LA	60	AFLUENTE
E1	LA	< LD	EFLUENTE
E1	LA	< LD	EFLUENTE
E1	LA	261	EFLUENTE
E1	LA	< LD	EFLUENTE
E1	LA	29	EFLUENTE
E2	LA	< LD	AFLUENTE
E2	LA	< LD	AFLUENTE
E2	LA	< LD	AFLUENTE
E2	LA	< LD	AFLUENTE
E2	LA	110	AFLUENTE
E2	LA	< LD	EFLUENTE
E2	LA	< LD	EFLUENTE
E2	LA	< LD	EFLUENTE
E2	LA	< LD	EFLUENTE
E2	LA	< LD	EFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	AFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	AFLUENTE
E2-17A	LA	22	AFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	AFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	AFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E2-17A	LA	< LD	EFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	EFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	EFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	EFLUENTE
E2-17A	LA	< LD	EFLUENTE
EE2	LA	1200	AFLUENTE
EE2	LA	< LD	AFLUENTE
EE2	LA	< LD	AFLUENTE
EE2	LA	575	AFLUENTE
EE2	LA	401	AFLUENTE
EE2	LA	< LD	EFLUENTE
EE2	LA	< LD	EFLUENTE
EE2	LA	< LD	EFLUENTE
EE2	LA	< LD	EFLUENTE
EE2	LA	< LD	EFLUENTE
CHOL	LA	< LD	AFLUENTE
CHOL	LA	14280	AFLUENTE
CHOL	LA	12015	AFLUENTE
CHOL	LA	157	AFLUENTE
CHOL	LA	401	AFLUENTE
CHOL	LA	6630	EFLUENTE
CHOL	LA	2900	EFLUENTE
CHOL	LA	< LD	EFLUENTE
CHOL	LA	< LD	EFLUENTE
CHOL	LA	69,23	EFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E1	UASB	1433	AFLUENTE
E1	UASB	512	AFLUENTE
E1	UASB	26	AFLUENTE
E1	UASB	< LD	AFLUENTE
E1	UASB	< LD	AFLUENTE
E1	UASB	< LD	EFLUENTE
E1	UASB	< LD	EFLUENTE
E1	UASB	< LD	EFLUENTE
E1	UASB	< LD	EFLUENTE
E1	UASB	< LD	EFLUENTE
E2	UASB	< LD	AFLUENTE
E2	UASB	776	AFLUENTE
E2	UASB	56	AFLUENTE
E2	UASB	23	AFLUENTE
E2	UASB	< LD	AFLUENTE
E2	UASB	< LD	EFLUENTE
E2	UASB	397	EFLUENTE
E2	UASB	< LD	EFLUENTE
E2	UASB	< LD	EFLUENTE
E2	UASB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	AFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	AFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	AFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	AFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	AFLUENTE

Contin. APÊNDICE C - Concentrações dos DEs e do micropoluente colesterol nas ETEs

Composto	ETE	Concentração (ng L ⁻¹)	Vazão
E2-17A	UASB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	EFLUENTE
E2-17A	UASB	< LD	EFLUENTE
EE2	UASB	< LD	AFLUENTE
EE2	UASB	371	AFLUENTE
EE2	UASB	586	AFLUENTE
EE2	UASB	< LD	AFLUENTE
EE2	UASB	< LD	AFLUENTE
EE2	UASB	< LD	EFLUENTE
EE2	UASB	< LD	EFLUENTE
EE2	UASB	132	EFLUENTE
EE2	UASB	< LD	EFLUENTE
EE2	UASB	< LD	EFLUENTE
CHOL	UASB	170	AFLUENTE
CHOL	UASB	153	AFLUENTE
CHOL	UASB	32,53	AFLUENTE
CHOL	UASB	2,79	AFLUENTE
CHOL	UASB	< LD	AFLUENTE
CHOL	UASB	< LD	EFLUENTE
CHOL	UASB	< LD	EFLUENTE
CHOL	UASB	23	EFLUENTE
CHOL	UASB	< LD	EFLUENTE
CHOL	UASB	< LD	EFLUENTE

APÊNDICE D – Testes estatísticos aplicados na determinação de CENO e CEO

<i>Teste de Fischer - Análise de sobrevivência</i>					
ETE	<i>Significância p⁷</i>				
	5%	10%	15%	20%	30%
CJW	0,474	0,211	NR ⁸	1,000	1,000
TB	NR	1,000	NR	NR	0,211
CNM	0,211	NR	NR	1,000	1,000
LA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
UASB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

<i>Teste de Fischer - Mudança de sexo</i>					
DEs	<i>Significância p</i>				
	0,5 µg L ⁻¹	1 µg L ⁻¹	2 µg L ⁻¹	4 µg L ⁻¹	8 µg L ⁻¹
	NR	NR	1,000	<u>0,043</u>	<u>0,043</u>

<i>Análise da reprodução: Teste de Normalidade (Shapiro Wilks)</i>					
ETE	<i>Significância p</i>				
	5%	10%	15%	20%	30%
CJW	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
TB	0,832	0,209	0,642	0,734	0,328
CNM	0,178	0,950	0,319	0,444	0,200

<i>Análise da reprodução: Teste de Wilcoxon's, Teste de Levene e Teste "t"</i>															
ETE	<i>Significância p</i>														
	5%			10%			15%			20%			30%		
	W	L	't'	W	L	't'	W	L	't'	W	L	't'	W	L	't'
CJW	1,00	NA ⁹	NA	0,06	NA	NA	0,92	NA	NA	1,00	NA	NA	0,92	NA	NA
TB	NA	0,29	0,84	NA	0,26	0,73	NA	0,44	0,19	NA	0,96	0,18	NA	0,08	<u>0,046</u>
CNM	NA	<u>0,003</u>	0,44	NA	0,33	0,05	NA	<u>0,009</u>	<u>0,006</u>	NA	0,08	0,17	NA	<u>0,041</u>	0,231

⁷ Os valores de $p < 0,05$ são considerados significativos (efeito tóxico), encontram-se sublinhados para melhor visualização.

⁸ NR – Teste de Fischer não foi realizado devido à inexistência de mortalidade na concentração analisada

⁹ NA – Teste não aplicável, dependendo do p valor obtido no teste de normalidade é decidido que testes serão realizados posteriormente, se paramétrico ou não paramétrico.

Contin. APÊNDICE D – Testes estatísticos aplicados na determinação de CENO e CEO

Análise da reprodução: Teste de Normalidade (<i>Shapiro Wilks</i>), Teste de <i>Wilcoxon's</i>, Teste de <i>Levene</i> e Teste “t”					
DEs	<i>Significância p</i>				
	0,5 µg L⁻¹	1 µg L⁻¹	2 µg L⁻¹	4 µg L⁻¹	8 µg L⁻¹
S - W	0,137	0,528	0,149	0,342	0,637
Wilcoxon's	NA	NA	NA	NA	NA
Levene	0,516	0,153	0,091	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
“t”	0,216	<u>0,024</u>	<u>0,008</u>	0,062	<u>0,016</u>

ANEXO A – Dados de projetos das ETEs selecionadas¹⁰

Parâmetros/ETE	CNM	Unidade	
Tipo	1 Lagoa facultativa		
Ano de implantação	1984		
Largura média	184		m
Maior dimensão no comprimento	457,5		m
Profundidade útil	2		m
Profundidade total	3		m
População de Projeto	12.705		habitantes
Qmin (Vazão)	29,03		L/s
Qmed	49,63		L/s
Qmax			
TDH (Tempo de detenção hidráulica)	26,4		dias
Volume total	113.203		m ³
Área total	6		ha

Parâmetros/ETE	CJW	TB	Unidade
Tipo	3 Lagoas: 1 facultativa e 2 de maturação	3 Lagoas: 1 facultativa e 2 de maturação	
Ano de implantação		1986	
1 facultativa			
Largura média		45	m
Maior dimensão no comprimento		90	m
Profundidade útil	1,8	1,5	m
Profundidade total			
TDH	11	10	dias
Volume			
Área	3,13	0,4087	ha
2 lagoas de maturação			
Largura média		38	m
Maior dimensão no comprimento		90	m
Profundidade útil	1,5	1,5	m
Profundidade total			
TDH (M1+M2)	10	8,4	dias
Volume			
Área (M1+M2)	3,42	0,3420	ha
População de Projeto	23.870	3.000	hab
Qmin	42,86	5,41	L/s
Qmed	59,44	7,57	L/s
Qmax	85,96	11,02	L/s
TDH	21	18,4	dias
Vtotal			
A total	7	0,7507	ha

¹⁰Dados fornecidos por CAGECE-Companhia de água e esgoto do Ceará

Contin. ANEXO A – Dados de projetos das ETEs selecionadas¹¹

Parâmetros/ETE	LA	Unidade
Tipo	Aeração prolongada seguida por uma unidade de desinfecção	
População de Projeto	2.880	hab
Vazão média final das águas residuárias	230,40	m ³ /dia
pH	7	
DBO ₅	300	mgO ₂ /L
DQO	650	mgO ₂ /L
Coliformes Termotolerantes	10 ⁶	CTer/100 mL
Coefficiente de produção de sólidos, em termos de DQO (Y _{obs})	0,21	kgDQO _{lodo} /kgDQO _{apl}
Concentração esperada para o lodo de descartes	4	%
Densidade do lodo	1.020	kg SST/m ³
Q med afluente	2,67	L/s
Q max afluente	6,00	L/s
Tempo de retenção celular (idade do lodo)	Desconhecido	dias

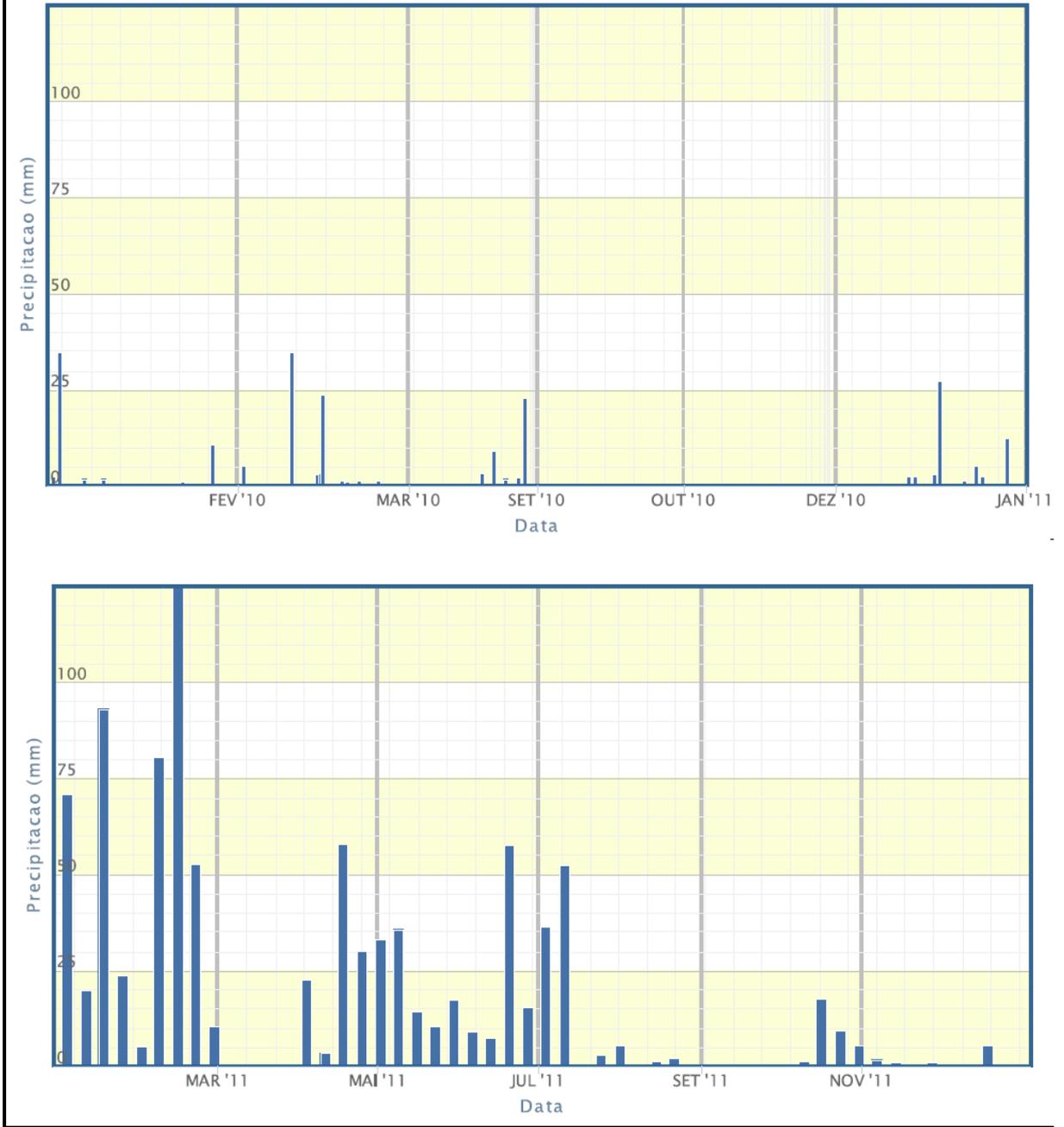
Parâmetros/ETE	UASB	Unidade
Tipo		
População Estimada de Projeto	1100	hab
Q média	5,50	m ³ /h
Velocidade Ascensional	0,70	m ³ /m ² /h
Altura útil	4,50	m
Tempo de Detenção Hidráulica	7	horas

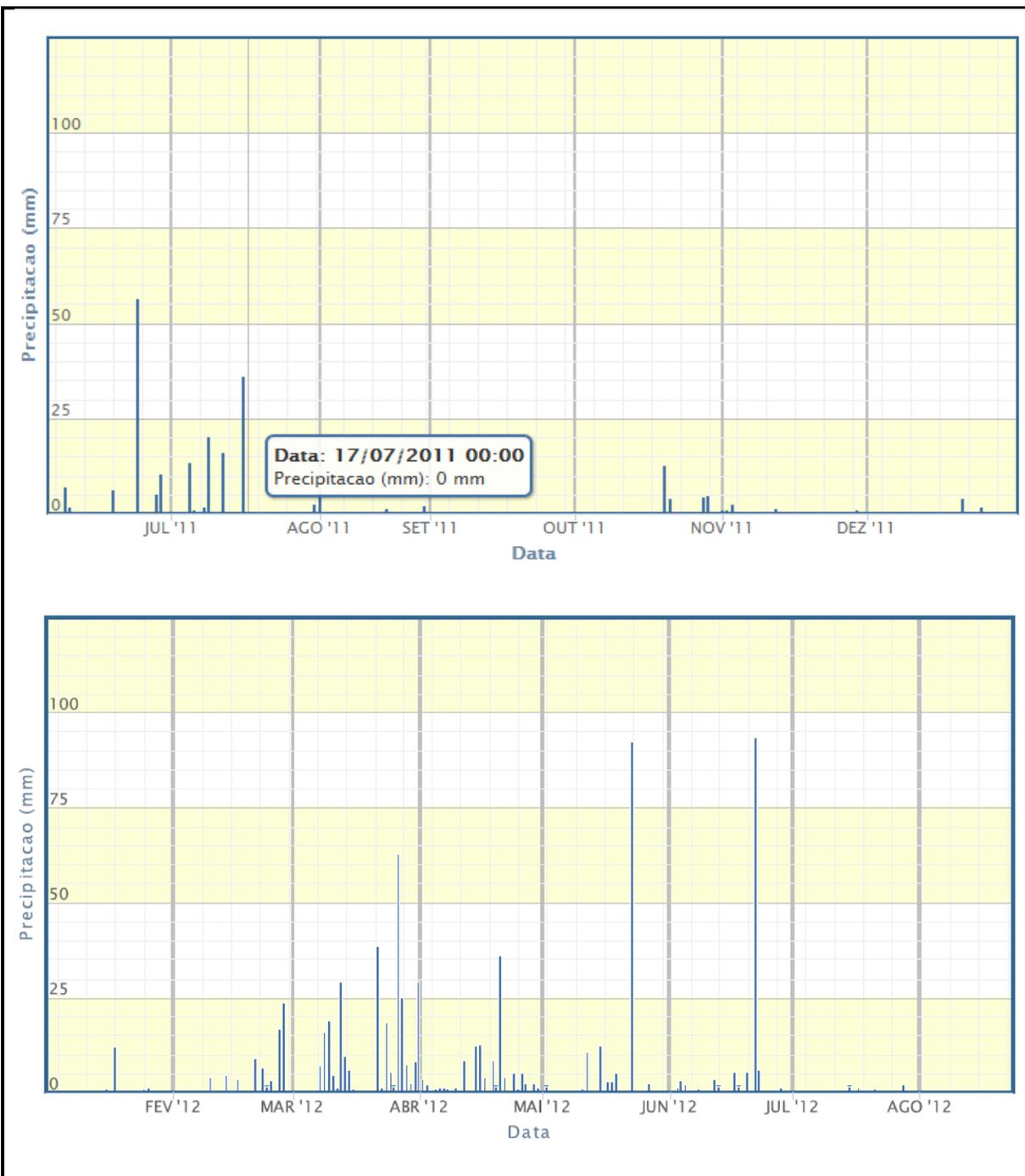
¹¹Dados fornecidos por CAGECE-Companhia de água e esgoto do Ceará

**ANEXO B – Metodologia utilizada para análises físico-químicas e
microbiológicas**

Parâmetro	Método analítico	Normatização
Cor	Colorimétrico	APHA - 2120 C
Turbidez	Nefelométrico	APHA - 2130 B
Condutividade	Potenciométrico	APHA - 2510 B
pH	Eletrométrico	APHA - 4500-H ⁺ B
Amônia	Destilação e Titulometria	APHA - 4500-NH ₃ B e C
Nitrato	Colorimétrico	HACH - 8171
Nitrito	Colorimétrico	HACH - 8507
Ortofosfato	Colorimétrico	HACH- 8048
DQO	Refluxação fechada - Colorimétrico	APHA – 5220 D
Cloreto	Argentométrico (método de Mohr)	APHA – 4500-Cl ⁻ B
Sólidos	Gravimétrico	APHA-2540
Alcalinidade	Titulométrico	APHA-2320B
Dureza	Titulométrico com EDTA	APHA-2340C
Sulfato	Turbidimétrico	APHA-4500-SO ₄ ²⁻ E
<i>E. coli</i>	Substrato Enzimático	Collilert

ANEXO C – Índice de precipitação na cidade de Fortaleza, nos anos de 2010- 2012





Fonte: INMET, 2012