



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Mariana Macêdo Barcellos

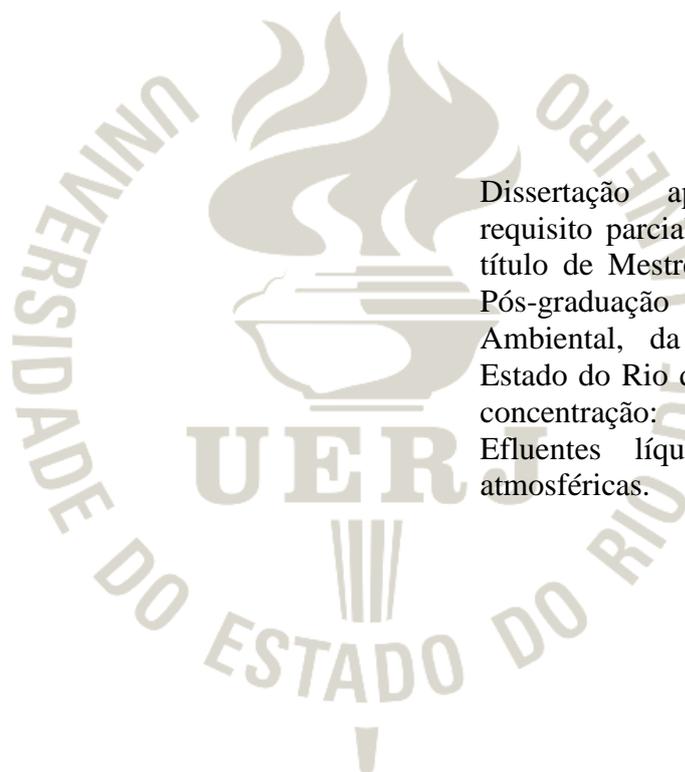
**Ocorrência de Hormônios Estrogênicos e Avaliação da Atividade
Estrogênica de Esgoto Bruto e Tratado em uma ETE do Município do
Rio de Janeiro (RJ)**

Rio de Janeiro

2016

Mariana Macêdo Barcellos

Ocorrência de hormônios estrogênicos e avaliação da atividade estrogênica de esgoto bruto e tratado de uma ETE do município do Rio de Janeiro (RJ)



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle de Efluentes líquidos e emissões atmosféricas.

Orientadora: Prof^ª. D.Sc. Daniele Maia Bila

Coorientador: Prof^º. D.Sc. Alexsandro Araújo da Silva

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

B242 Barcellos, Mariana Macêdo.

Ocorrência de hormônios estrogênicos e avaliação da atividade estrogênica de esgoto bruto e tratado de uma ETE do município do Rio de Janeiro / Mariana Macêdo Barcellos. – 2016.

76f.

Orientador: Daniele Maia Bila.

Coorientador: Alessandro Araújo da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia Ambiental 2. Esgotos - Dissertações. 3. Esgoto - Estação de tratamento - Dissertações. 4. Cromatografia líquida - Dissertações. 5. Desreguladores endócrinos - Dissertações. I. Bila, Daniele Maia. II. Silva, Alessandro Araújo da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 628.2

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

Assinatura

Data

Mariana Macêdo Barcellos

Ocorrência de hormônios estrogênicos e avaliação da atividade estrogênica de esgoto bruto e tratado de uma ETE do município do Rio de Janeiro (RJ)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle de Efluentes líquidos e emissões atmosféricas.

Aprovada em 15 de abril de 2016.

Banca examinadora:

Dra. Daniele Maia Bila (Orientadora)
Faculdade de Engenharia – UERJ

Dr. Alexsandro Araujo da Silva (Coorientador)
Instituto de Química – UERJ

Dr. Enrico Mendes Saggioro
ENSP – FIOCRUZ

Dr. André Luiz de Sá Salomão
Faculdade de Engenharia - UERJ

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

Sem medo de ser clichê, primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado sabedoria, forças para superar os desafios e por ter colocado pessoas tão importantes no meu caminho durante essa trajetória.

Aos meus pais Mônica e Rubens por não medirem esforços para permitir que eu tivesse um bom preparo para chegar até aqui, pela educação, amor e preocupação.

Obrigada, vocês são muito importantes na minha vida!

Ao meu irmão Matheus que sempre diz se espelhar em mim e a minha vizinha Maricea pelo carinho sem igual e por sempre demonstrar ter orgulho das minhas conquistas. Amo vocês!

Ao meu marido Bruno que desde a época da escola sempre me incentivou, pela compreensão quando precisei diversas vezes trocá-lo pelo computador em plena fase de recém casados. Obrigada, amor. Agora você terá uma esposa mestre!

À minha querida orientadora Daniele Bila pela oportunidade, por ter aceito esse título, por ter sido sempre tão solícita, respondendo minhas mensagens e tirando as minhas dúvidas a qualquer hora nos finais de semana. Obrigada por me tranquilizar, principalmente, nessa fase final e por sempre acreditar no meu potencial. Te admiro muito, me orgulharei todas as vezes em que eu ler um artigo que te referencia.

Ao professor Alexsandro Araújo por ter aceito me coorientar trazendo tanta novidade para o meu aprendizado, tendo paciência para sanar minhas inúmeras dúvidas na cromatografia, inclusive aos finais de semana e por ter se empenhado contribuindo para o sucesso do meu trabalho. Obrigada, professor!

As amigas que me fizeram companhia durante os dias de trabalho no LES, Fernanda, Flávia e Mariana Luna. Obrigada por terem me cedido todos os favores que precisei, por terem sido tão fofas e por demonstrarem torcer pelo meu sucesso. A Louise, Mariah, Rita e Sidney por ter me ajudado nas análises que precisei. Peço a Deus que traga oportunidades maravilhosas para vocês, vocês merecem todo sucesso do mundo!

A querida Larissa que esteve mais pertinho durante a parte prática no laboratório, por ter me acompanhado nas coletas e ter me ensinado tanta coisa. Desejo muito sucesso para você. Boa sorte nessa nova fase!

Em especial a Giselle, por ter sido tão importante para mim nessa trajetória,

desde o primeiro contato por e-mail. Obrigada Gi pela paciência em me ensinar o ensaio YES e tantas outras coisas, por ter se disposto a trabalhar para me ajudar até mesmo no final de semana com toda boa vontade. Que Deus te acompanhe nessa nova jornada!

Um agradecimento especial também para a Carol Gomes, que foi sempre muito solícita, me ajudando tanto com aquele jeitinho doce que só ela tem. Muito obrigada Carolzita, você foi muito importante! Toda felicidade do mundo pra você!

A equipe do LABIFI que contribuiu com a leitura das placas do ensaio YES.

Obrigada a equipe da ETE por contribuir com tanta solicitude para o desenvolvimento do meu trabalho. Serei eternamente grata!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais uma fase acadêmica na minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

BARCELLOS, Mariana Macêdo. **Ocorrência de hormônios estrogênicos e avaliação da atividade estrogênica de esgoto bruto e tratado de uma ETE do município do Rio de Janeiro (RJ)**. 2016. 75f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Diversos resíduos de compostos químicos, estrogênios naturais e sintéticos considerados contaminantes emergentes têm sido encontrados em matrizes ambientais. Embora detectados em concentrações traço, esses micropoluentes são capazes de promover alterações no sistema endócrino, interferindo no crescimento, reprodução e desenvolvimento dos organismos a eles expostos. A identificação dos desreguladores endócrinos pode ser realizada por métodos analíticos que envolvem técnicas de concentração e extração dos analitos aliadas as análises cromatográficas. Além disso, ensaios *in vitro* como o YES (*Yeast estrogen screen*) permitem determinar a atividade estrogênica dos compostos e amostras ambientais. Neste trabalho analisou-se a presença da atividade estrogênica no esgoto bruto e tratado de uma ETE do município do Rio de Janeiro, e quantificou as concentrações de estrogênios sintéticos e naturais. Os parâmetros físico-químicos também foram determinados, e a partir dos testes estatísticos de correlação de *Spearman* foi possível avaliar a relação entre os parâmetros físico-químicos e as concentrações dos estrogênios. Quanto aos resultados encontrados pelo ensaio *in vitro* YES, apenas uma amostra dentre as 10 analisadas não apresentou atividade estrogênica. O maior valor médio de EQ-E2 encontrado foi de 4,61 ng.L⁻¹. O estrogênio predominantemente detectado foi o estriol, com as concentrações variando entre 0,261 µg.L⁻¹ e 7,136 µg.L⁻¹. O 17 α-etinilestradiol foi detectado em apenas uma amostra de esgoto bruto dentre as 20 analisadas e em quatro amostras de esgoto tratado tendo a menor concentração 0,049 µg.L⁻¹ e a maior 0,564 µg.L⁻¹. O estradiol foi detectado em apenas uma amostra de esgoto bruto com concentração de 0,64 µg.L⁻¹. Diante da avaliação das concentrações encontradas, levando em consideração que a maioria das amostras apresentou efeito de estrogenicidade e ainda que os processos convencionais de tratamento não removem completamente os micropoluentes, convém propor que mais estudos sejam voltados para a implementação de tratamentos eficazes para a remoção, afim de reduzir a presença dos mesmos em matrizes ambientais e, conseqüentemente, os efeitos danosos aos organismos a eles expostos.

Palavras-chave: Esgoto; Ensaio *in vitro* YES; Cromatografia Líquida.

ABSTRACT

BARCELLOS, Mariana Macêdo. **Estrogens concentration assessment in raw and treated sewage in a WWTP of Rio de Janeiro municipality (RJ)**. 2016. 75f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Several chemical residues natural and synthetic estrogens considered emerging contaminants have been found in environmental matrices. Although detected in trace concentrations, these micropollutants are able to promote changes in the endocrine system, interfering in the growth, reproduction and development of organisms exposed to them. The identification of endocrine disruptors may be performed by analytical methods that involve techniques of analytes concentration and extraction coupled with chromatographic tests. In addition, *in vitro* assays (Yeast estrogen screen) allow to detect estrogenic activity of the compounds and environmental samples. In this study it was analyzed the presence of estrogenic activity by the YES test in raw and treated sewage samples in a WWTP of Rio de Janeiro municipality, and the chromatographic analyzes were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The physical and chemical parameters were analyzed, and using the statistical test Spearman correlation it was possible to evaluate the relationship between the physical and chemical parameters and the concentrations of estrogens. The results of the *in vitro* assay YES, have shown that in only one sample among 10 samples had no estrogenic activity. The highest average value of EQ-E2 found was 4,61 ng.L⁻¹. The estrogen that was mainly detected was estriol, with concentrations ranging from 0.261µg.L⁻¹ and 7,136µg.L⁻¹. Estrogen was predominantly detected estriol with concentrations ranging from 0.261 µg.L⁻¹ and 7,136 µg.L⁻¹. The 17α - ethinylestradiol was detected in only one raw sewage sample from the 20 samples analyzed and treated sewage in four samples having the lowest concentration 0.049 µg. L⁻¹ and the highest 0.564 µg.L⁻¹. Estradiol was detected in only one raw sewage sample concentration of 0.64 µg.L⁻¹. Taking into account that most of the samples showed estrogenicity effect and although conventional treatment processes do not completely remove the micropollutants, it is recommended that more studies should be performed on this subject, focusing on the implementation of effective treatments for micropollutants removal, in order to reduce their presence in environmental matrices and increase the effects on organisms exposed to them.

Keywords: Emerging contaminants; Sewage; In vitro assay YES; HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma das etapas de tratamento da ETE estudada.....	32
Figura 2 - Fluxograma da metodologia analítica utilizada no ensaio YES e cromatografia.....	34
Figura 3 - Aparatos para a realização da filtração das amostras	36
Figura 4 - Aparatos para a realização da extração em fase sólida.....	37
Figura 5 - Placa de análise intercalando o controle positivo, o branco e a amostra	42
Figura 6 - Foto da placa de análise no ensaio YES após 72 horas de incubação	42
Figura 7 - Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol no ensaio YES	50
Figura 8 - Curva dose-resposta do composto 17 α -etinilestradiol na faixa de concentração 2724 a 1,33 ng.L ⁻¹ no ensaio YES	51
Figura 9 - Curva dose-resposta do composto estrona na faixa de concentração 7500 a 3,66 ng.L ⁻¹ no ensaio YES	52
Figura 10 - Curva dose-resposta do composto estriol no ensaio YES na faixa de concentração 7500 a 3,62 ng.L ⁻¹ no ensaio YES	53
Figura 11 - Valores médios de equivalente estradiol (EQ-E2) obtidos no ensaio YES das amostras de esgoto bruto e efluente de ETE coletados no período de junho a agosto de 2015	54
Figura 12 - Curva dose-resposta da amostra de esgoto bruto 4E no ensaio YES.....	55
Figura 13 - Curva dose-resposta da amostra de esgoto bruto 3E no ensaio YES.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de desreguladores endócrinos detectadas em amostras ambientais relatadas na literatura brasileira (continua)	21
Tabela 2 - Identificação das amostras de esgoto bruto e tratado coletadas na ETE no período de junho a dezembro de 2015.....	33
Tabela 3 - Concentrações teóricas dos estrogênios na curva de calibração.	46
Tabela 4 - Composição do esgoto sintético preparado para a realização do estudo de recuperação.....	47
Tabela 5 - Concentrações dos padrões de E2, EE2 e E3 nas amostras de esgoto sintético.	47
Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos analisados nas amostras de esgoto bruto e tratado e respectivas metodologias de acordo com o APHA (2012).	48
Tabela 7 - Estimativa da toxicidade das amostras de esgoto bruto e tratado coletadas na ETE no ensaio YES	56
Tabela 8 - Resultados dos parâmetros físico-químicos de todas as amostras coletas na entrada e na saída.....	57
Tabela 9 - Equação da reta, coeficiente de correlação e tempo de retenção para os três estrogênios obtidos em uma mesma corrida cromatográfica.....	58
Tabela 10 - Concentrações dos estrogênios encontrados nas amostras de esgoto bruto e tratado coletadas da ETE no período de junho a dezembro de 2015.....	58
Tabela 11 - Resultados do teste de correlação de Spearman entre parâmetros físico-químicos e concentração dos estrogênios em esgoto bruto e tratado.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABES	Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Abs	Absorvância
Abs _{corrigida}	Absorvância corrigida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPRG	Chlorophenolred- β -D-galactopyranoside
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
DAD	Detector de arranjos de diodos
DEs	Desreguladores endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DQO	Demanda química de oxigênio
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EDC	Endocrine disrupters chemicals
EE2	17 α -etinilestradiol
EFS	Extração em fase sólida
EPA	Environmental Protection Agency
ETE	Estação de tratamento de esgoto
ETA	Estação de tratamento de água
EQ-E2	Equivalentes de estradiol
ERE	Elementos de respostas de estrogênio
HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto de Metrologia
LD	Limite de detecção
LES	Laboratório de Engenharia Sanitária

LQ	Limite de quantificação
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
YES	<i>Yeast estrogen screen</i>
VTG	Vitelogenina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1. OBJETIVOS	15
1.1 Geral	15
1.2 Específicos	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Desreguladores endócrinos	16
2.2 Estrogênios.....	17
2.3 Concentrações dos estrogênios em matrizes ambientais e efeitos nos organismos expostos.....	18
2.4 Remoção de desreguladores endócrinos em plantas de tratamento de esgoto .	26
2.5 Legislação brasileira	27
2.6 Métodos analíticos para determinação de desreguladores endócrinos em matrizes ambientais	28
2.7 Uso do ensaio <i>in vitro</i> YES para avaliação de atividade estrogênica em amostras ambientais.....	30
3. METODOLOGIA	32
3.1 Local e período de coleta das amostras	32
3.2 Limpeza e descontaminação do material	33
3.3 Procedimento de coleta e armazenamento das amostras	34
3.4 Preparo das amostras coletadas para o ensaio <i>in vitro</i> YES e para a cromatografia.....	35
3.4.1 Filtração das amostras	35
3.4.2 Extração em Fase Sólida (EFS).....	36
3.5 Ensaio <i>in vitro</i> YES	37
3.5.1 Reagentes.....	37
3.5.2 Preparo das Soluções do Meio de Cultivo.....	38
3.5.3 Preparo da levedura	39
3.5.4 Preparo do meio com a cultura de leveduras e do meio de análise	39
3.5.5 Preparo das soluções padrões para o ensaio YES.....	40
3.5.6 Procedimento do Ensaio YES	40
3.5.7 Análise dos dados do ensaio YES	42

3.6	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
3.6.1	Aparatos e condições da cromatografia.....	45
3.6.2	Preparo da curva analítica.....	45
3.6.3	Teste de recuperação da EFS	47
3.7	Caracterização físico-química das amostras de esgoto bruto e efluente de ETE e correlação de Spearman	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Ensaio YES	50
4.1.1	Controle positivo 17 β estradiol	50
4.1.2	Determinação da atividade estrogênica dos padrões de EE2, E1 e E3.....	50
4.1.3	Determinação da atividade estrogênica das amostras.....	53
4.1.4	Toxicidade nas amostras de esgoto bruto e efluente de ETE no ensaio YES	54
4.2	Caracterização físico química das amostras de esgoto bruto e efluente de ETE e correlação de Spearman.....	57
4.3	Quantificação das concentrações de estrogênios por cromatografia líquida de alta eficiência.....	58
5.	CONCLUSÃO	61
	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE 1: Curva dose-resposta das amostras de esgoto bruto e tratado.....	71
	APÊNDICE 2: Curva analítica desenvolvida para a análise do E3.....	74
	APÊNDICE 3: Curva analítica desenvolvida para a análise do EE2	75
	APÊNDICE 4: Curva analítica desenvolvida para a análise do E2.....	76

INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são, usualmente, o destino dos descartes de diversos contaminantes oriundos de fontes poluidoras domésticas e/ou industrial. Resíduos de compostos de medicamentos, cosméticos, produtos de limpeza, derivados de práticas agrícolas e alguns dos estrogênios naturais são considerados “contaminantes emergentes” que podem expor a saúde humana a diferentes riscos (ONESIOS, et al., 2009; LIMA, 2013; WATKINSON et al., 2007). No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, a preocupação com esse tipo de problema deve ser ainda maior, visto a precariedade das condições de saneamento e o consequente despejo de efluentes sem tratamento prévio adequado no ambiente natural. Segundo dados do IBGE (2010), 808 dentre os 1668 municípios da região sudeste brasileira dispõem de instalação de tratamento de água e esgoto, e em apenas 461 estações realiza-se o tratamento biológico. De acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – SINIS, o volume de esgoto tratado no país saltou de 3,624 bilhões de m³ em 2013 para 3,764 bilhões de m³ em 2014, ano do último diagnóstico realizado até a presente data. No entanto, as estações de tratamento de água e de esgoto do Brasil não são projetadas para obter uma elevada eficiência na remoção de microcontaminantes, mas são voltadas para remover material particulado e dissolvido, o que exige um aprofundamento dos estudos dedicados a esses processos (DEBLONDE et al., 2011; LIU et al., 2009; YOON et al., 2007; DIAS et al., 2015; BRASIL, 2016).

Os chamados desreguladores endócrinos (DEs) fazem parte do grupo dos contaminantes emergentes encontrados em matrizes ambientais na ordem de microgramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$) ou nanogramas por litro (ng L^{-1}) e possuem a capacidade de promover alterações no sistema endócrino, interferindo no crescimento, reprodução e desenvolvimento dos organismos a eles expostos (KOIFMAN e PAUMGARTTEN, 2002; BROWN et al., 2007; LEITE e AFONSO, 2010). Os produtos industriais, alguns fármacos, plastificantes, produtos de higiene pessoal, pesticidas, estrogênios naturais e sintéticos são exemplos de compostos que exibem atividade estrogênica, ou seja, são capazes de produzirem respostas quando ligados a um receptor de estrogênio (BECK et al., 2006; BILA e DEZOTTI, 2007).

Os estrogênios podem ser divididos em naturais, como o 17β -estradiol, estriol e estrona, e sintético, como 17α -etinilestradiol, ambos são frequentemente introduzidos no esgoto através da urina e das fezes de mulheres, homens e animais e apresentam elevada estrogenicidade (BILA e DEZOTTI, 2007; REIS FILHO, 2006; SCHLEICHER, 2013).

Embora haja uma dificuldade na identificação desses compostos em ambientes naturais, métodos analíticos envolvendo técnicas de concentração de analitos e de detecção por cromatografia vem sendo desenvolvidos para determinação e quantificação desses microcontaminantes (BHANDARI et al., 2009; VIRKUTYTE et al., 2010; WATKINSON et al., 2007).

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar a ocorrência e quantificar a presença dos estrogênios naturais e sintéticos em esgoto bruto e tratado de uma ETE do município do Rio de Janeiro e investigar a atividade estrogênica dos efluentes.

1.2 Específicos

- Identificar e quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as concentrações de estrogênios naturais e sintético em amostra de esgoto bruto e tratado de uma ETE;
- Avaliar a atividade estrogênica das amostras de esgoto bruto e tratado de uma ETE pelo ensaio *in vitro* YES;
- Avaliar a toxicidade das amostras no ensaio *in vitro* YES.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desreguladores endócrinos

Um grupo de substâncias químicas denominado desreguladores endócrinos (DE) tem chamado a atenção da comunidade científica. Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA, 1997) um DE é definido como um “agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e / ou comportamento”. Encontrados em matrizes ambientais em concentrações da ordem de microgramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$) ou nanogramas por litro (ng L^{-1}), os DE são capazes de interferir no sistema endócrino causando efeitos adversos sobre a saúde, o crescimento, o comportamento e anomalias na função reprodutiva humana e de outros animais (KOIFMAN e PAUMGARTTEN, 2002; LEITE e AFONSO, 2010).

A suspeita da existência de compostos que interagem com o sistema endócrino não é recente. Em 1950, estudos já constatavam que elevadas doses do pesticida DDT produzia feminização em galos *White leghorn* por causar atrofia testicular (KOIFMAN; PAUMGARTTEN, 2002). A exposição intrauterina ao potente estrógeno sintético dietil-estilbestol (DES) indicava associação com o desenvolvimento de adenocarcinoma vaginal durante a adolescência e no início da idade adulta, nos anos 60 (KOIFMAN e PAUMGARTTEN, 2002; BILA e DEZOTTI, 2007). Inclusive, nessa mesma década, a autora Rachel Carlson já atentava para os problemas provocados pela bioacumulação de pesticidas causadores da insuficiência reprodutiva em aves ao publicar seu livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa) (CARSON, 2010). Em 1980 novamente foram observadas características femininas em animais do sexo masculino, além de outros diversos estudos que relacionavam diferentes alterações nos organismos com a exposição a algumas substâncias químicas (KOIFMAN e PAUMGARTTEN, 2002; BILA e DEZOTTI, 2007). No entanto, somente na década de 90 iniciou-se de forma mais aprofundada o debate sobre as consequências da exposição humana e de animais

selvagens aos desreguladores endócrinos (KOIFMAN e PAUMGARTTEN, 2002; BILA e DEZOTTI, 2007).

A presença dessas substâncias nas águas naturais pode ocorrer tanto por fontes pontuais, como efluentes de estação de tratamento, efluentes domésticos e industriais e lixiviados provenientes de resíduos sólidos urbanos, quanto por fontes difusas, como pela infiltração no solo de compostos industriais ou agrícolas, que contaminam lençóis freáticos, fossas sépticas, espalhamento de lamas provenientes do tratamento de águas residuais entre outros (GHISELLI e JARDIM, 2007).

As formas de exposição a esses desreguladores podem ser direta ou indiretamente por ingestão de água ou alimentos contaminados, através do contato com ar ou solo ou ainda pela administração de fármacos, como os antibióticos, anti-inflamatórios, anticoagulantes, analgésicos, anticoncepcionais e anestésicos (BILA e DEZOTTI, 2007; FILHO et. al., 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os efeitos variam desde alterações na fisiologia e no comportamento sexual de espécies, até alterações permanentes, como a diferenciação sexual (IPCS, 2002; KOIFMAN et al., 2002; PARIS et al., 2006). Em geral, as consequências provocadas pela exposição aos DE são alterações fisiológicas e histológicas em animais; Feminização e masculinização de espécies; hermafroditismo; inibição do desenvolvimento das gônadas; redução do tamanho e afinamento nas cascas de ovos; disfunção dos ovários; maior possibilidade de aparecimento de câncer de mama, vagina, testículo e próstata; comprometimento da fertilidade; indução da vitelogenina em peixes; aumento da taxa de aborto espontâneo; possível ocorrência de endometriose; deformidade nos órgãos reprodutivos; além do comprometimento dos níveis de hormônios tireoidais (BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007; IPCS, 2002; HYNDMAN et al., 2010; LU et AL., 2011).

2.2 Estrogênios

Os estrogênios são hormônios sexuais femininos que controlam os ciclos reprodutivos, promovem a proliferação de células nos órgãos sexuais, (útero e seios), influenciam no crescimento, comportamento e desenvolvimento, além de atuarem no sistema imunológico, cardiovascular e na diferenciação morfológica (TAPIERO, 2002;

NASSIF et al., 2005; RAIMUNDO, 2007; ECKERT et al., 2008). Os estrogênios também são usados de forma terapêutica, como contraceptivos orais e em tratamentos para reposição hormonal. Os estrogênios sintéticos possuem características químicas e farmacológicas semelhantes as dos estrogênios naturais, porém apresentam suas estruturas moleculares alteradas e tendem a ser mais ativos e potentes do que os naturais (RAIMUNDO, 2007; PESSOA, 2012; SCHLEICHER, 2013).

Os estrogênios naturais, como o 17β -estradiol, estriol e estrona, e o sintético, 17α -etinilestradiol, causam preocupação por apresentarem elevada estrogenicidade e serem continuamente introduzidos no esgoto por meio da urina e das fezes de mulheres, homens e animais (BILA e DEZOTTI, 2007; REIS FILHO, 2006; SCHLEICHER, 2013). Ao serem excretados pela urina e pelas fezes, os estrogênios naturais ou os sintéticos apresentam-se em sua forma biologicamente inativa conjugadas, não apresentando atividade biológica direta, porém ao serem lançados no ambiente natural, esses metabólitos podem ser hidrolisados e desconjugados pelas bactérias fecais (*Escherichia coli*) e não são removidos pelos processos convencionais de tratamento, sendo detectados em baixas concentrações em águas superficiais de diversos países (COLEMAN et al., 2004; SODRE et al, 2007; FERREIRA, 2008; SCHLEICHER, 2013).

Além de os estrogênios naturais causarem preocupação por possuírem efeito desregulador, os sintéticos são considerados persistentes no ambiente, com capacidade de se acumularem nos sedimentos e ao longo da cadeia trófica, expondo os organismos vivos a maiores riscos (MEYER; SARCINELLI e MOREIRA, 1999). Portanto, ressalta-se a importância de controlar os DEs nos mananciais e avaliar os processos de tratamento envolvidos na remoção dessas substâncias, pois no Brasil, por exemplo, a maioria dos efluentes urbanos não sofre tratamento terciário (SILVA e COLLINS, 2011; BILA, 2005).

2.3 Concentrações dos estrogênios em matrizes ambientais e efeitos nos organismos expostos

Alguns estudos descrevem a presença de diferentes concentrações de estrogênios em algumas matrizes ambientais (Tabela 1) e as análises ratificam que a continua

exposição aos desreguladores endócrinos com efeito estrogênico pode promover alterações nos organismos, mesmo em concentrações muito baixas (NOGUEIRA, 2003; ROUTLEDGE et al., 1998; ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; TANAKA et al., 2001).

O 17- β estradiol quando encontrado na ordem de nanograma/litro pode induzir o aumento da produção de vitelogenina (VTG) em espécies masculinas de peixes (AURIOL et al., 2006; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WEBER et al., 2004). A VTG é uma proteína produzida no fígado sob controle estrogênico e está presente na circulação sistêmica em animais ovíparos e ovovivíparos. É frequentemente utilizada como biomarcador para detectar a atividade estrogênica de uma substância, pois em condições normais, no macho há uma baixa produção ou não detectada dessa proteína, em função da baixa concentração de estrogênio na corrente sanguínea, no entanto, quando expostos a substâncias estrogênicas a VTG pode ser produzida em quantidades similares às produzidas por fêmeas sexualmente maduras (SCHMID et al., 2002; GHISELLI e JARDIM, 2007; MORAES, 2008).

Embora apresentem fisiologias, morfologias, dentre outras características, mecanismos e funções diferentes, os peixes e os mamíferos apresentam semelhanças patológicas quando expostos a substâncias endócrinas ativas, portanto, utilizar os peixes como animais-teste é relevante para medicina quando se trata de estudos sobre os efeitos nos organismos humanos (WESTER et al., 2004).

Em 2001, Metcalfe e colaboradores observaram que peixes da espécie *Oryzias latipes* (Medaka) quando expostos a concentração de 1 μgL^{-1} de E2 apresentaram edema generalizado em órgãos como o coração, rim e fígado. Concentrações de 0,01 μgL^{-1} provocavam hermafroditismo nesta mesma espécie. (METCALFE et al., 2001) O EE2 foi tóxico para Medaka na concentração de 1 μgL^{-1} restando apenas indivíduos do sexo feminino (METCALFE et al., 2001). Quando expostos à estrona em uma concentração de 10 μgL^{-1} os peixes apresentaram edema, principalmente, nos rins (METCALFE et al., 2001). Já em estudos com o estriol foi observado resultados um pouco diferentes, como uma intensidade de resposta menos grave quando comparado aos outros estrogênios e apenas 1 macho, dentre os 40 testados, apresentou hermafroditismo quando expostos a uma concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em 2003, Segner e colaboradores observaram efeitos como o atraso na maturidade, redução da produção de ovos e da fertilização, além de alterações histológicas nas gônadas em peixes da espécie *Danio rerio* quando expostos durante 75 dias a uma concentração de 0,00167 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ de EE2. Neste mesmo ano, Hill e Janz ao estudarem os efeitos da exposição

estrogênica no desenvolvimento da espécie de peixe anteriormente citada, foi observado que quando expostos a $0,01 \mu\text{gL}^{-1}$ de EE2 a maioria apresentou gônadas não desenvolvidas, além de um atraso na gametogênese e na diferenciação sexual. Orn e colaboradores (2003) encontraram concentrações significativamente elevadas de vitelogenina ($168 \pm 67 \text{ ng/g}$) em *Danio rerio* expostos a $0,002 \mu\text{g.L}^{-1}$ de EE2. Dietrich e colaboradores (2010) ao analisarem o efeito do EE2 no crustáceo *Daphnia magna* concluíram que é uma espécie muito sensível se tratando dos representantes do primeiro nível trófico, pois quando exposta a concentrações de $0,0001 \mu\text{g.L}^{-1}$ de EE2 apresentou problemas reprodutivos, como a redução do número de filhotes e efeitos no crescimento.

Em 2013, Lei e colaboradores (LEI et al., 2013) descreveram a ação da estrona nas fases iniciais de vida de espécies de peixe *Oryzias latipes* e observaram efeitos diversos sobre a eclodibilidade, tempo de incubação e anomalias quando expostos a uma concentração de no mínimo $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$

Em 2016, Morthorst e colaboradores publicaram um estudo sobre a malformação induzida pela exposição a estrogênios durante a embriogênese em um vivíparo bentônico da espécie *Zoarces viviparus* que comumente habita as zonas marítimas costeiras do Norte da Europa. Os resultados mostraram que concentrações de $0,0178 \mu\text{g/L}$ de EE2 aumentava significativamente a frequência de malformação em embriões.

Tabela 1 - Concentrações de desreguladores endócrinos detectadas em amostras ambientais relatadas na literatura brasileira (continua)

Substância	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Localidade	Referência
17 β - Estradiol (E2)	0,0275 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta – São Carlos (SP)	FILHO, 2008
	0,33 – 13,45 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta / Rio Atuba - Curitiba (PR)	MACHADO, 2010
	2,09 – 6,28 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta / Rio Iguaçu–Curitiba(PR)	
	< 0,552 (LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta / Rio Paraíba do Sul – Taubaté (SP)	OTOMO, 2010
	< 0,552(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta / Rio Paraíba do Sul –Pindamonhangaba (SP)	
	< 0,552(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta / Rio Paraíba do Sul – São José dos Campos (SP)	
	< 0,552(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta / Rio Paraíba do Sul – Guararema (SP)	
	< 0,876(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada / Rio Paraíba do Sul–Pindamonhangaba (SP)	
	< 0,876(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada - / Rio Paraíba do Sul – Taubaté (SP)	
	< 0,876(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada / Rio Paraíba do Sul – São José dos Campos (SP)	
	< 0,876(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada / Rio Paraíba do Sul – Guararema (SP)	
	0,00525 – 0,00727 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta da ETA/ Sumaré (SP)	GEROLIN, 2008
	0,00102 – 0,00148 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada da ETA / Sumaré (SP)	
	0,00907 – 0,003 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta da ETA / Campinas (SP)	
	0,00078 – 0,00105 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada da ETA / Campinas(SP)	
	0,099 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de José Walter / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	PESSOA, 2012
	<0,03758 (LQ) - 0,125 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
<0,01128 (LD) - 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de Nova Metrópole/ Região Metropolitana de Fortaleza (CE)		
<0,01128 (LD) – 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto bruto ETE de Nova Metrópole / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)		

Tabela 1 - Concentrações de desreguladores endócrinos detectadas em amostras ambientais relatadas na literatura brasileira (continuação)

Substância	Concentração (μgL^{-1})	Localidade	Referência
17 β - Estradiol (E2)	<0,01128 (LD) – 0,5 μgL^{-1}	Esgoto bruto ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza	PESSOA, 2012
	<0,01128 (LD) – 0,21 μgL^{-1}	Esgoto bruto ETE de José Walter / Região Metropolitana de Fortaleza	
	4,0 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE de José Walter / Região Metropolitana de Fortaleza	
	3,42 μgL^{-1}	Esgoto bruto ETE de Nova Metrópole / Região Metropolitana de Fortaleza	SOUZA, 2011
	6,69 \pm 0,03 μgL^{-1}	Esgoto bruto ETE Samambaia / Campinas (SP)	GHISELLI, 2006
	5,56 \pm 0,06 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE Samambaia / Campinas (SP)	
17 α - Etinilestradiol (EE2)	< 0,045(LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia (Estação de captação de água da Companhia de Saneamento do Município de Atibaia) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	RAIMUNDO, 2007
	< 0,045(LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia (Antes do aporte do Ribeirão Pinheiro) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	< 0,045 (LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	< 0,045(LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia (Município de Paulínia, à jusante de um polo industrial) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	< 0,045(LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia (Represa de Salto Grande) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	< 0,045(LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia (aproximadamente 200m da sua afluição no Rio Jaguari) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	< 0,045(LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Ribeirão Pinheiros / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	0,464 – 6,806 μgL^{-1}	Água bruta /Rio Anhumas/ Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	< 0,045(LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Capivari/ Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	0,779 – 4,325 μgL^{-1}	Água bruta /Rio Jundiá / Região Metropolitana de Campinas (SP)	

Tabela 1 - Concentrações de desreguladores endócrinos detectadas em amostras ambientais relatadas na literatura brasileira (continuação)

	0,0114 – 0,0301 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta – São Carlos (SP)	FILHO, 2008
	0,16 – 5,90 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta / Rio Atuba– Curitiba (PR)	MACHADO, 2010
	0,6 – 4,53 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta /Rio Iguaçú –Curitiba(PR)	
	0,798 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta da ETA/ Sumaré (SP)	GEROLIN, 2008
	0,472 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada da ETA/ Sumaré (SP)	
	0,444 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta da ETA/ Campinas (SP)	
	0,275 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água tratada da ETA/ Campinas (SP)	
17 α - Etinilestradiol (EE2)	0,08 – 0,84 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de José Walter / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	PESSOA, 2012
	0,358–<1,41643(LD) $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	0,1 – <1,41643 (LD) $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de Nova Metrópole / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	<0,01128 (LD)–0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de Nova Metrópole / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	< 1,41643 (LD) $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	0,087 – 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de José Walter / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	0,197 – 0,305 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água de abastecimento residencial/ Piracicaba (SP)	TORRES, 2009
	1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	SOUZA, 2011
	5,81 \pm 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto bruto ETE Samambaia / Campinas (SP)	GHISELLI, 2006
	5,04 \pm 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto tratado ETE Samambaia / Campinas (SP)	
	< 0,064 (LQ) - 37,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	ETE Mangueira/ Região Metropolitana do Recife (PE)	SILVA et al., 2012
	< 0,064(LQ) $\mu\text{g L}^{-1}$	ETE Caçote/ Região Metropolitana do Recife (PE)	
< 0,064(LQ) - 37,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	ETE Cabanga/ Região Metropolitana do Recife (PE)		
<0,016 (LD) $\mu\text{g L}^{-1}$	Água bruta /Rio Atibaia (Represa de Salto Grande) / Região Metropolitana de Campinas (SP)		

Tabela 1 - Concentrações de desreguladores endócrinos detectadas em amostras ambientais relatadas na literatura brasileira (continuação)

Substância	Concentração (μgL^{-1})	Localidade	Referência
17 α - Ethinilestradiol (EE2)	<0,016 (LD) μgL^{-1}	Água bruta/ Rio Atibaia (Município de Paulínia, à jusante de um polo industrial) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	RAIMUNDO, 2007
	<0,016 (LD) μgL^{-1}	Água bruta/ Rio Atibaia (À aproximadamente 1600m após o aporte do Ribeirão Pinheiro) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	<0,016 (LD) μgL^{-1}	Água bruta/ Rio Atibaia (Antes do aporte do Ribeirão Pinheiro) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	<0,016 (LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia (Estação de captação de água da Companhia de Saneamento do Município de Atibaia) / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	<0,016 (LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Atibaia/ Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	<0,016 (LD) μgL^{-1}	Água bruta /Rio Ribeirão Pinheiros / Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	0,981 – 4,39 μgL^{-1}	Água bruta /Rio Anhumas/ Região Metropolitana de Campinas (SP)	
	<0,016 (LD) – 0,337 μgL^{-1}	Água bruta /Rio Capivari/ Região Metropolitana de Campinas (SP)	
<0,016 (LD) – 0,725 μgL^{-1}	Água bruta / Rio Jundiá / Região Metropolitana de Campinas (SP)		
Estrona (E1)	0,29 - 0,76 μgL^{-1}	Água bruta /Rio Iguazu – Curitiba(PR)	MACHADO, 2010
	0,1 – 1,8 μgL^{-1}	Água bruta / Rio Atuba – Curitiba (PR)	
	0,4 μgL^{-1}	Água bruta / Rio Itaquí - Curitiba (PR)	
	<0,864 (LQ) μgL^{-1}	Água tratada / Rio Paraíba do Sul – Pindamonhangaba (SP)	OTOMO, 2010
	<0,864(LQ) μgL^{-1}	Água tratada / Rio Paraíba do Sul – Taubaté (SP)	
	<0,864(LQ) μgL^{-1}	Água tratada / Rio Paraíba do Sul – São José dos Campos (SP)	
	<0,864(LQ) μgL^{-1}	Água tratada / Rio Paraíba do Sul – Guararema (SP)	

Tabela 1 - Concentrações de desreguladores endócrinos detectadas em amostras ambientais relatadas na literatura brasileira (conclusão)

Substância	Concentração (μgL^{-1})	Localidade	Referência
Estrona (E1)	0,00033 – 0,00054 μgL^{-1}	Água bruta da ETA/ Sumaré (SP)	GEROLIN, 2008
	0,00015 – 0,0116 μgL^{-1}	Água bruta da ETA/ Campinas (SP)	
	<0,00003 (LQ)-0,0001 μgL^{-1}	Água tratada da ETA/ Campinas (SP)	
	0,004 – 0,12 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE de José Walter / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	PESSOA, 2012
	<0,03538 (LD) – 2,08 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	<0,03538(LD)–0,529 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE de Nova Metrópole / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	<0,03538(LD) – 3,05 μgL^{-1}	Esgoto bruto ETE de Nova Metrópole / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	0,239- 1 μgL^{-1}	Esgoto bruto ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	<0,03538 (LD)– 0,35 μgL^{-1}	Esgoto bruto ETE de José Walter / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	
	4,35 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE de Nova Metrópole / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	SOUZA, 2011
	1,69 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE de Tabapuá / Região Metropolitana de Fortaleza (CE)	GHISELLI, 2006
	4,83 \pm 0,05 μgL^{-1}	Esgoto bruto/ ETE Samambaia / Campinas (SP)	
	4,13 \pm 0,06 μgL^{-1}	Esgoto tratado ETE Samambaia / Campinas (SP)	
Estrilol (E3)	0,00109 – 0,0061 μgL^{-1}	Água bruta da ETA/ Sumaré(SP)	GEROLIN,2008
	0,00148 – 0,00205 μgL^{-1}	Água tratada da ETA/ Sumaré (SP)	
	0,003 – 0,00393 μgL^{-1}	Água bruta da ETA/ Campinas (SP)	
	0,00043 – 0,00124 μgL^{-1}	Água tratada da ETA/ Campinas (SP)	
	0,116 – 0,146 μgL^{-1}	Água bruta / Rio Corumbataí (SP)	TORRES, 2009
	0,137 μgL^{-1}	Água bruta / Rio Piracicaba (SP)	
	0,114 – 0,314 μgL^{-1}	Água de abastecimento residencial/ Piracicaba (SP)	
	0,00334 – 0,029 μgL^{-1}	Água bruta da ETA/ Sumaré(SP)	GEROLIN,2008

Correlacionando as concentrações dos estrogênios encontrados em diversas matrizes ambientais descritos na Tabela 1 com a literatura pesquisada, nota-se que em relação ao EE2 possivelmente, as concentrações encontradas causariam algum efeito aos organismos a ele exposto. Alguns estudos detectaram $38,8 \mu\text{gL}^{-1}$ (SILVA et al., 2013) em uma ETE o que causa preocupação, uma vez que uma concentração de $0,001 \mu\text{gL}^{-1}$ já é suficiente para causar efeitos danosos aos organismos (MATTHIESSEN et al., 2006; ROUTLEDGE et al., 1998). Com relação ao E2 (que varia entre $0,00078 \mu\text{gL}^{-1}$ e $13,45 \mu\text{gL}^{-1}$), somente as concentrações encontradas por Gerolin (2008) em água bruta e tratada de uma Estação de Tratamento de Água (ETA) possivelmente não causariam nenhum efeito aos organismos. No entanto, há de se considerar que ainda existe o efeito sinérgico, que intensifica o efeito dessas substâncias no organismo. Concentração de até $13,45 \mu\text{gL}^{-1}$ foi encontrada em água superficial por Machado (2010), sendo que $0,01 \mu\text{gL}^{-1}$ é capaz de provocar hermafroditismo em peixes da espécie *Oryzias latipes* (METCALFE et al., 2001). No que se refere à estrona, as concentrações encontradas por Souza (2011) e Ghiselli (2006), respectivamente, $4,35 \mu\text{gL}^{-1}$ e $4,83 \mu\text{gL}^{-1}$, também podem interferir no sistema endócrino, uma vez que organismos expostos a concentrações de $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$ já apresentam efeitos crônicos.

2.4 Remoção de desreguladores endócrinos em plantas de tratamento de esgoto

Os tratamentos convencionais em estações de tratamento de esgoto são ineficientes no processo de remoção dos desreguladores implicando, muitas vezes, na presença desses compostos em águas superficiais, subterrâneas e inclusive as destinadas ao abastecimento público (LOPES e MOURA, 2008; DOLAR, et al., 2012; AQUINO, 2013).

Em 1999, Ternes e colaboradores verificaram que pelo processo de lodo ativado o E2 era removido completamente e a estrona e o EE2 tiveram uma remoção de 83 e 78%, respectivamente (TERNES et al., 1999). Tan e colaboradores (2007) e Kanda e Churchley (2008) também relataram a eficiência do tratamento por lodos ativados com remoções superiores a 95% para o E1 e E2. Em estudo realizado por Pessoa e colaboradores envolveu a determinação das concentrações de estrogênios em ETEs da região metropolitana de Fortaleza foi verificado a eficiência de sistemas de lodos

ativados e lagoa facultativa seguida de lagoa de maturação na remoção de estrogênios, inclusive com uma ETE alcançando a remoção de 100% de estrona.

Esse tipo de remoção envolve um processo complexo, pois depende de diversos aspectos como a idade do lodo, o tempo de retenção hidráulica, carga orgânica e diversas condições ambientais (CLARA, et al.,2004) No Brasil as pesquisas voltadas para a análise das águas superficiais e detecção dos compostos desreguladores não são suficientes, e apesar de existirem alternativas para a remoção desses compostos, exigem grandes investimentos. A falta de investimentos em saneamento básico e a necessidade de adequação das estações de tratamento a esse tipo de remoção propiciam um cenário onde os micropoluentes permanecerão nos mananciais comprometendo a saúde dos organismos.

2.5 Legislação brasileira

No Brasil, o Decreto nº 5472 de 2005 (Brasil, 2005a) que promulga o texto da Convenção de Estocolmo sobre os Poluentes Orgânicos Persistentes, apresenta uma lista de substâncias que apresentam propriedades tóxicas, são persistentes e bioacumulam, causando diversos danos aos organismos e ao meio ambiente. Algumas substâncias presentes na lista são suspeitas de desregulação endócrina, contudo, não foram incluídas por esse efeito que são expressos em baixíssimas concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1}). Além disso, não inclui os estrogênios que são as substâncias com maior potencial estrogênico.

A Portaria MS nº 2.914 de 2011 (Brasil, 2011), que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, embora defina padrões para diversos compostos químicos orgânicos e inorgânicos, não designa um limite para as substâncias classificadas como desreguladores endócrinos. Em 2012, foi publicado “Guia de potabilidade para substâncias químicas” (UMBUZEIRO, 2012) com o objetivo de elucidar de maneira técnica e científica os setores engajados na saúde e no meio ambiente promovendo discussões sobre a priorização de substâncias químicas no Estado de São Paulo, e a proteção da saúde da população que tem acesso a essas águas que não se enquadram nos padrões de potabilidade ou são derivadas de áreas contaminadas. Este documento dispõe de uma lista de 291 substâncias prioritárias identificadas em

mananciais, ainda não regulamentadas, dentre elas: estrona, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol. No entanto, uma combinação de critérios foi estabelecida para a permanência ou exclusão dessas substâncias nesta lista. Foram excluídas as substâncias que já haviam sido relacionadas pela Portaria MS nº 2.914/2011; as que não são relevantes para a água de consumo, conforme avaliação de um grupo técnico; e os contaminantes emergentes que ainda não permitem estabelecer doses de referência, de acordo com a avaliação de sua toxicidade. Após o estabelecimento desses critérios, os estrogênios que estavam incluídos na lista geral, foram excluídos da lista principal que contem 72 substâncias químicas.

Portanto, considerando que no Brasil ainda não há padrões de lançamento de DEs estabelecidos por lei e que essa problemática não é de fácil resolução, ainda serão necessários não só o desenvolvimento de mais estudos e métodos que provem seu potencial de desregulação, mas também, a adoção de medidas legislativas que reprimam seu despejo de forma inadequada no ambiente natural.

2.6 Métodos analíticos para determinação de desreguladores endócrinos em matrizes ambientais

Apesar da quantificação dos micropoluentes orgânicos em matrizes ambientais ainda ser um desafio, a manipulação e um preparo adequado das amostras permite a detecção dessas substâncias em concentrações inferiores a 1 ng.L^{-1} (RODRIGUES-MOZAZ et.al.,2015). Uma vez que nas matrizes ambientais existem outros compostos que não os de interesse para a análise, os analitos precisam passar por uma etapa de pré-concentração e *clean up* da amostra. Uma das técnicas utilizadas para concentrar os estrogênios é a extração em fase sólida (EFS) (OTOMO, 2010; PESSOA, 2012). Nesta técnica utiliza-se um cartucho contendo um material adsorvente (fase sólida) apropriado para as propriedades físico-químicas do analito a ser retido, seguido de um solvente para eluição desses analitos em fase líquida (QUEIROZ, 2011; PESSOA, 2012).

A etapa inicial para realização da EFS é o condicionamento do cartucho com o uso de solventes adequados para ativar os sítios ativos e ativar o material adsorvente; em seguida é feita a percolação da amostra pelo cartucho para que os compostos fiquem retidos; a terceira etapa é a denominada *clean up* na qual realiza-se uma lavagem do

cartucho com um solvente orgânico para remoção de possíveis interferentes e por fim, é feita a eluição dos analitos de interesse utilizando um solvente para posterior análise (RAIMUNDO, 2007; OTOMO, 2010).

É também importante considerar o desenvolvimento analítico em relação aos métodos cromatográficos de detecção dos analitos encontrados em concentrações muito baixas (PESSOA, 2011). A cromatografia é uma técnica utilizada para separar, determinar e quantificar compostos de interesse contidos em uma mistura em baixas concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} (DEGANI, 1998 OTOMO, 2010; PESSOA, 2012). A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são muito utilizadas para quantificar os compostos estrogênicos, no entanto o grau de especificidade do equipamento e o tipo do componente da amostra irão determinar a escolha do método mais adequado (BIRKETT; LESTER, 2003).

É possível quantificar, através de sinais, o componente de interesse presente no eluente. O detector é parte do cromatógrafo responsável por realizar esse procedimento recebendo e fornecendo o sinal. Ele deve apresentar alta sensibilidade, boa velocidade de resposta, não sofrer interferência da temperatura da fase móvel, baixo ruído e ainda uma resposta linear a um grande número de solutos (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000). Existem diferentes tipos de detectores como UV, fotodiodos, condutividade elétrica, eletroquímico, espalhamento de luz, amperométrico, índice de refração e fluorescência, a escolha dependerá dos compostos a serem determinados (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000; BIRKETT & LESTER, 2003) O sistema de detecção por fluorescência foi o utilizado no presente trabalho, ele apresenta sensibilidade que permite análises de traços na cromatografia líquida (SCOTT, 2003).

A CLAE é uma técnica que se adequa a análise de uma variedade de compostos orgânicos que apresentam baixa volatilidade e polaridade mais alta, como alguns poluentes orgânicos, além de apresentar alta sensibilidade (SKOOG, HOLER E NIEMAN, 2001; COLLINS e SILVA, 2011). No entanto, para quantificação dos compostos, é necessário que a metodologia utilizada seja adequada ao cromatógrafo e sua validação deve permitir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados. Assim, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto de Metrologia) dispõem de alguns preceitos que orientam a validação dos métodos analíticos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010):

- Seletividade: definida como a capacidade que o método possui de mensurar exatamente um composto em presença de interferentes que podem aumentar ou reduzir o sinal.

- Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. As três formas mais comuns de expressá-las é através da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

- Recuperação/ tendência: mede a eficiência da extração de um método da quantidade conhecida do analito.

- Robustez: mede a capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Quando maior a robustez, maior é a confiança em relação à precisão.

- Linearidade: é a capacidade que o método possui de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito.

- Limite de Detecção (LD): corresponde ao menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. Esse parâmetro varia em função do tipo de amostra.

- Limite de Quantificação (LQ): é a menor quantidade do analito que pode ser determinado em uma amostra, com precisão e exatidão aceitáveis.

2.7 Uso do ensaio *in vitro* YES para avaliação de atividade estrogênica em amostras ambientais

Em amostras ambientais encontram-se, majoritariamente, uma mistura complexa de substâncias químicas conhecidas e desconhecidas, tornando inviável a identificação e quantificação dos compostos e de seus metabólitos. Além disso, o potencial estrogênico causado pelos desreguladores endócrinos nem sempre pode ser mensurado por análises químicas em função das interações antagonistas e sinérgicas. Ensaio *in vitro* é uma ferramenta importante para a detecção de efeitos adversos, além de ser um método rápido, sensível e capaz de rastrear a atividade estrogênica das amostras (BISTAN et.al., 2012; JAROSOVA, 2014).

Esses ensaios possibilitam analisar as substâncias químicas presentes na amostra que possuem a capacidade de mimetizar a ação de um estrogênio pela interação com o receptor de estrogênio humano (REh). Seguindo a metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996) a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada hospeda um gene REh integrado ao genoma principal que ao ser expresso é capaz de se acoplar aos elementos de respostas de estrogênio (ERE) dentro de um promotor híbrido na expressão do plasmídeo. A ativação do receptor pela ligação de um estrogênio promove a expressão do gene repórter lac-Z que codifica a enzima β -galactosidase, essa enzima é capaz de metabolizar o substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida (CPRG) presente no meio. Ao ser metabolizado, o CPRG muda da cor amarela para rosa/vermelho. A estimativa da quantidade de substância estrogênica se dá pela medida da absorbância pela espectrofotometria, a produção de β -galactosidase é diretamente proporcional à quantidade dessas substâncias no meio (SILVA et al., 2002; BRIX, et al, 2010).

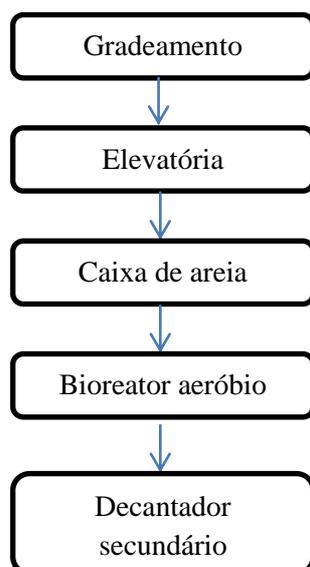
Bistan e colaboradores (2014) consideram o ensaio *in vitro* YES como uma ferramenta adequada de rastreio para a monitorização do potencial de estrogenicidade de efluentes que são lançados em águas superficiais, alcançando uma detecção de até 90% da atividade estrogênica em amostras concentradas em uma ETE e ETA. Dias e colaboradores (2015) analisaram águas coletadas a partir de um importante sistema hidrológico no Brasil e por meio do ensaio *in vitro* YES também observaram a atividade estrogênica das amostras de água.

3. METODOLOGIA

3.1 Local e período de coleta das amostras

As coletas de amostras foram realizadas em uma estação de tratamento localizada no município do Rio de Janeiro no período de junho a dezembro de 2015. As amostras de esgoto bruto foram coletadas na entrada da estação, na elevatória e as de esgoto tratado foram coletadas no decantador secundário. Foram realizadas amostragens simples, não respeitando o tempo de detenção hidráulica da planta. A Figura 1 apresenta o fluxograma das etapas de tratamento da ETE estudada.

Figura 1 - Fluxograma das etapas de tratamento da ETE estudada.



As amostras foram identificadas de acordo com a data e o local de coleta, os códigos foram representados na Tabela 2. Foram coletadas 10 amostras de esgoto bruto e 10 amostras de esgoto tratado, sendo que as amostras 2E, 2S, 4E, 4S, 6E, 6S, 8E e 8S foram coletadas em duplicata e as demais apenas uma amostra. Todas as amostras coletadas foram analisadas pela cromatografia (CLAE), no entanto, para a realização do ensaio YES utilizou-se as amostras 1E, 1S, 2E, 2S, 3E, 3S, 4E, 4S, 6E e 6S.

Tabela 2 - Identificação das amostras de esgoto bruto e tratado coletadas na ETE no período de junho a dezembro de 2015.

Código utilizado para amostras de esgoto bruto da ETE	Código utilizado para amostras de esgoto tratado coletadas na saída do decantador secundário da ETE	Data da coleta
1E	1S	01/06/2015
2E	2S	15/06/2015
3E	3S	01/07/2015
4E	4S	20/07/2015
5E	5S	03/08/2015
6E	6S	17/08/2015
7E	7S	18/09/2015
8E	8S	09/10/2015
9E	9S	22/12/2015
10E	10S	29/12/2015

E= entrada da ETE; S= saída da ETE

3.2 Limpeza e descontaminação do material

Todas as vidrarias dedicadas para o ensaio *in vitro* YES e a cromatografia foram previamente limpas, descontaminadas e de uso exclusivo, seguindo a metodologia adaptada de Pereira (2011). Todos os materiais, inclusive o frasco para coleta, foram deixados de molho em uma solução de detergente (Extran®/ Merck) a 10%, por 24 horas, enxaguados 10 vezes com água da torneira, rinsados com acetona (grau HPLC, Tedia, Vetec) e enxaguados 5 vezes com água ultrapura obtida do sistema Milli-Q (fornecido pela Millipore®), por último rinsados com etanol absoluto (grau HPLC, Tedia) e enxaguados por 3 vezes novamente com água ultrapura. Após esse

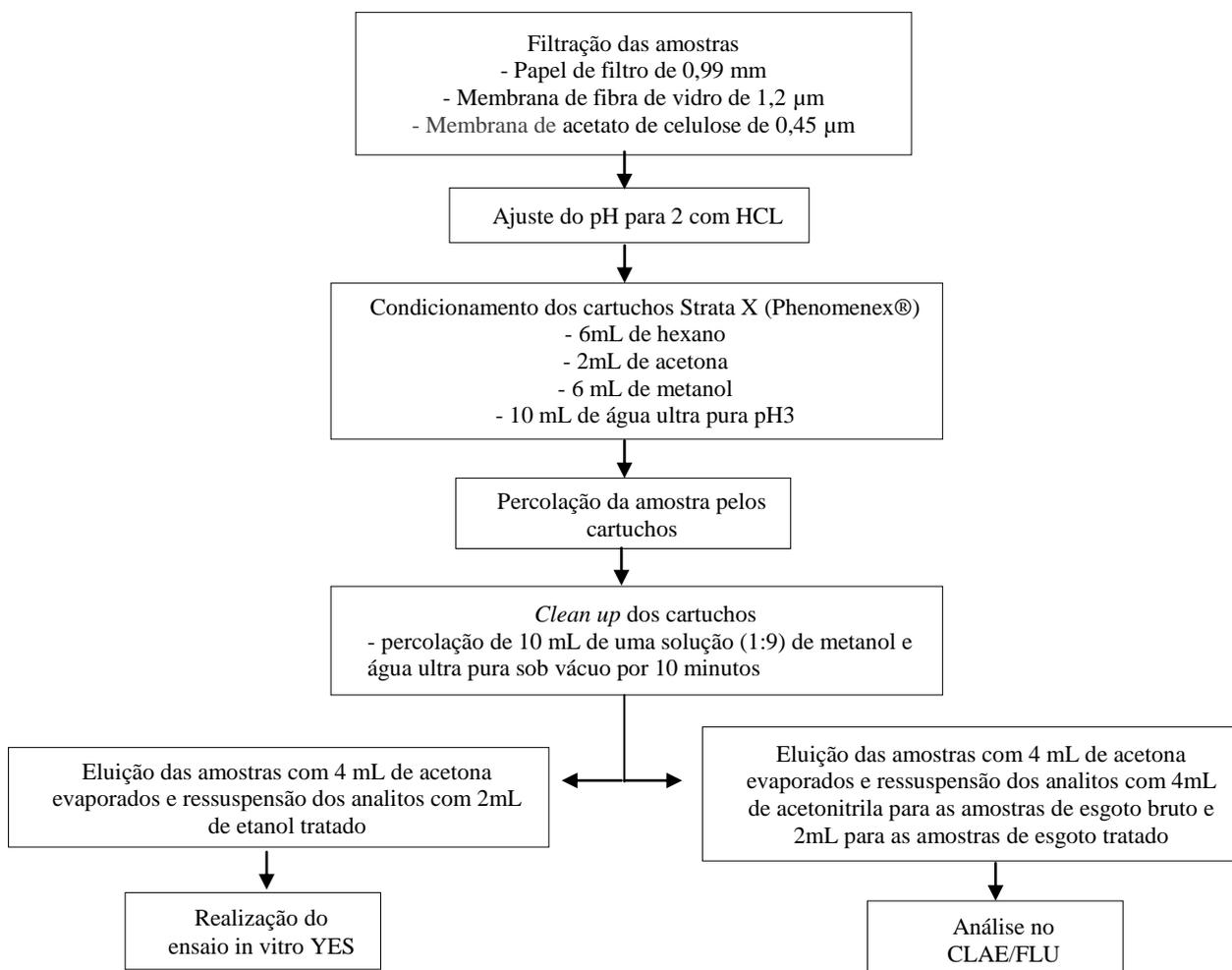
procedimento as vidrarias foram deixadas na estufa para completa secagem e posteriormente envolvidas por um papel laminado e armazenados em locais limpos e exclusivos (PEREIRA, 2011).

3.3 Procedimento de coleta e armazenamento das amostras

As amostras foram coletadas em frascos âmbar de 1L contendo 10 mL de metanol (grau HPLC, Tedia) na proporção de 1% V/V de amostra para evitar uma possível degradação microbiológica. Após a coleta, os frascos foram mantidos em isopores com gelo durante o transporte até o laboratório onde foram mantidos na geladeira a 4°C para futuras análises (CORDEIRO, 2009).

O fluxograma apresentado na Figura 2 mostra as etapas de preparo das amostras até o extrato final para a realização do ensaio YES e para análise no HPLC.

Figura 2 - Fluxograma da metodologia analítica utilizada no ensaio YES e cromatografia



3.4 Preparo das amostras coletadas para o ensaio *in vitro* YES e para a cromatografia

3.4.1 Filtração das amostras

As amostras foram retiradas da geladeira e deixadas em repouso por aproximadamente 2 horas até alcançar o equilíbrio com a temperatura ambiente para então serem filtradas. Foi utilizado um sistema de bomba a vácuo (Figura 3), papel de filtro 0,9 mm (J.C.Binzer, Hatzfeld/Eder) para a remoção do material particulado, filtros de membranas de microfibras de vidro sem resina de 1,2 µm (Merck) e, posteriormente, de acetato de celulose de 0,45 µm (Merck). Com auxílio de uma proveta, foi mensurado 1 litro de cada amostra filtrada e posteriormente armazenada em frascos âmbar. O pH da amostra foi ajustado para 2 com ácido clorídrico (HCl) 3M grau P.A. Merck. Para evitar possível contaminação, utilizou-se tiras indicadoras universal de pH (Merck).

Figura 3 - Aparatos para a realização da filtração das amostras



3.4.2 Extração em Fase Sólida (EFS)

Para a etapa de extração dos analitos seguiu-se a metodologia utilizada por CORDEIRO (2009). Utilizou-se um sistema a vácuo em Manifold Agilent – VacElut 12 (Figura 4). Os cartuchos Strata-X de 500mg/6mL obtidos da Phenomenex® foram previamente condicionados pela passagem de 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura acidificada com ácido clorídrico para pH 3. Posteriormente, 1 litro da amostra com pH ajustado foi percolado em cada cartucho numa taxa de gotejamento de 3 mL min^{-1} . Para remoção dos interferentes, na fase denominada *clean-up*, percolou-se uma solução de 10 mL de metanol e água ultra pura em uma proporção de 1:9. Foi realizada a secagem total do cartucho de EFS no vácuo por 10 minutos. Posteriormente, os cartuchos foram individualmente embalados com papel laminado e armazenados no *freezer* à -20°C . Os analitos foram eluídos com 4 mL de acetona sob ação da gravidade e o eluído foi diretamente acondicionado em frascos de vidro de 10 mL. Posteriormente, ligou-se a bomba a vácuo durante 5 minutos para

completa secagem do cartucho. Os extratos das amostras foram evaporados à secura com fluxo de nitrogênio gasoso. Subsequentemente, as amostras foram ressuspensas com 2mL de etanol para a realização do ensaio YES. Para a injeção no cromatógrafo, ressuspendeu-se as amostras da entrada da estação com 8 mL de acetonitrila e as amostras da saída com 4 mL de acetonitrila.

Figura 4 - Aparatos para a realização da extração em fase sólida



3.5 Ensaio *in vitro* YES

3.5.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram L-leucina, L-histidina, adenina, L-arginina-HCl, L-metionina, L-tirosina, L-isoleucina, L-lisina-HCl, L-fenilalanina, L-ácido glutâmico, L-valina, L-serina, tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, inositol, D-glucose, ácido

aspártico, L-treonina, sulfato de cobre (II) e KOH peletes, biotina e o CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) obtidos da Sigma-Aldrich.

3.5.2 Preparo das Soluções do Meio de Cultivo

Todos os recipientes de vidro utilizados no preparo das soluções foram submetidos aos procedimentos de limpeza e descontaminação seguindo o protocolo anteriormente mencionado. O preparo da solução de vitamina se deu da seguinte forma: em um frasco de vidro esterilizado adicionou-se 8 mg de tiamina, 8 mg de piridoxina, 8 mg de pantetonato de cálcio, 40 mg de inositol e 20 mL de solução de biotina (2mg/100 mLH₂O) em 180 mL de água. A solução foi filtrada e esterilizada em membrana de 0,2 μ m estéril, e estocada em alíquotas de 10 mL a 4°C em frascos de vidro esterilizados. Uma solução de 20% p/v de glicose foi esterilizada em alíquotas de 20 mL a 121°C por 10 min e estocada em temperatura ambiente. Uma solução de 4 mg.mL⁻¹ de ácido aspártico foi esterilizada em alíquotas de 20 mL a 121°C por 10 min e estocada a temperatura ambiente. Preparou-se 24 mg.mL⁻¹ de L-treonina, esterilizou-se em alíquotas de 5 mL a 121°C por 10 min e estocou-se a 4°C. Uma solução de 20 mM de sulfato de cobre (II) foi preparada, filtrada, esterilizada em membrana de 0,2 μ m e estocada a temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados. Preparou-se também uma solução estoque de 10 mg.mL⁻¹ de CPRG com água estéril e estocou-se a 4°C em frascos de vidro esterilizados.

O meio mínimo foi preparado pela adição de 13,61 g de KH₂PO₄, 1,98g (NH₄)₂SO₄, 4,2g de KOH peletes, 0,2g de MgSO₄, 1mL de solução de Fe₂(SO₄)₃ (40mg/50 mL H₂O), 50 mg de L-leucina, 50 mg de L-histidina, 50 mg de adenina, 20mg de L-arginina-HCl, 20 mg de L-metionina, 30 mg de L-tirosina, 30 mg de L-isoleucina, 30 mg de L-lisina-HCl, 25 mg de L-fenilalanina, 100 mg de L-ácido glutâmico, 150 mg de L-valina, e 375 mg L-serina para 1 L de água. Armazenou-se a solução em frascos de vidro e foram armazenadas em temperatura ambiente.

O meio de cultivo foi, portanto, constituído pela mistura de 5mL de glicose + 1,25mL de ácido aspártico + 0,50mL de vitamina + 0,40 mL de treonina + 125 μ L de sulfato de cobre e 45 mL de meio mínimo.

3.5.3 Preparo da levedura

Previamente a realização do ensaio YES, a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi cultivada segundo procedimento descrito em Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações, 72 horas antes foi realizado o pré-inóculo. Em um frasco “T” pipetou-se 10 mL do meio de cultivo em toda a solução estoque de levedura contida em um tubo criogênico, homogeneizou-se lentamente e o frasco permaneceu por 24 horas na incubadora de bancada com agitação orbital (Marca Quimis modelo Q816M20) a 30°C em uma rotação de 150 rpm. No dia seguinte foi realizado a segunda etapa do preparo da levedura, o inóculo ou repique. Em um novo frasco “T” pipetou-se 10 mL do meio de cultivo e 100 µL da levedura previamente preparada e o manteve na mesma incubadora novamente por mais 24 horas, desta forma, ela estava preparada para a realização do ensaio. A cepa da levedura utilizada foi cedida pela professora Márcia Dezotti (UFRJ).

3.5.4 Preparo do meio com a cultura de leveduras e do meio de análise

A cultura de leveduras deve apresentar um valor de absorvância para ser considerada ideal para o preparo do meio de análise. A partir de uma adaptação do método original de Routledge e Sumpter (1996), utilizou-se o seguinte procedimento se a absorvância apresentasse um valor entre 0,8 a 1,0 a faixa era considerada boa, portanto a cultura estava pronta para o uso; caso a absorvância fosse inferior a 0,8 seria preciso adicionar alíquotas de levedura para se atingir a absorvância de 0,8 e se a absorvância fosse superior a 1,0 seria necessária a adição de alíquotas de meio de

cultura. Para verificação desta absorvância preparou-se em capela de fluxo laminar uma solução em um tubo do tipo Falcon estéril adicionando 8,0 mL do meio de cultivo e 4mL do cultivo da levedura e leu-se a absorvância a 620 nm.

O meio de análise foi preparado na capela de fluxo laminar através da adição de 25 mL de meio de cultivo, 250 μL do substrato cromogênico CPRG e 25 μL do meio com a cultura de levedura em tubos do tipo Falcon ou em frascos de vidro previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos.

3.5.5 Preparo das soluções padrões para o ensaio YES

As soluções estoques de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol foram preparadas com etanol absoluto grau HPLC da Tedia Brasil em uma concentração de 54,45 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para a estrona preparou-se uma concentração de 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e para o estriol 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, conforme estudos já realizados anteriormente.

3.5.6 Procedimento do Ensaio YES

Realizou-se o ensaio in vitro YES em 10, do total de 20 amostras coletadas (esgoto bruto e tratado). A análise do ensaio foi realizada de acordo com a metodologia de ROUTLEDGE e SUMPTER (1996), com algumas modificações. Utilizou-se microplacas de 96 poços com fundo chato estéril (marca NestBiotech) e as análises foram preparadas em uma capela de fluxo laminar previamente descontaminada com álcool a 70% e mantida sob luz UV durante 15 minutos. As ponteiras utilizadas durante o ensaio foram todas estéreis. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Primeiramente, foi preciso fazer uma diluição dos extratos das amostras. Para isso, separou-se uma microplaca para diluição, nela inicialmente adicionou-se 100 μL de etanol (grau HPLC) com o auxílio de uma pipeta de multicanais, exceto nos primeiros poços de cada fileira sucessivamente, ou seja, em 11, dos 12 poços. A quantidade de fileiras utilizadas foi de acordo com a quantidade de amostras a serem analisadas. No primeiro poço de cada fileira adicionou-se 200 μL do extrato da amostra. A diluição foi

feita através da transferência de 100 μL do extrato da amostra de um poço para o seguinte, homogeneizando com a própria pipeta por aproximadamente 5 vezes em cada um.

Uma nova placa de 96 poços foi separada, desta vez para o preparo da análise. Imediatamente após a diluição de cada fileira transferiu-se 10 μL do extrato das amostras diluídas para os 12 poços da primeira fileira da placa de análise, esse procedimento foi realizado em duplicata para cada amostra. Com uma pipeta de multicanais adicionou-se 10 μL de etanol absoluto nas fileiras que não contém as amostras diluídas e deixou-se evaporar por aproximadamente 40 minutos dentro da capela de fluxo laminar. Transferiu-se 200 μL do meio de reação, primeiramente nos poços com etanol absoluto e posteriormente nos poços que contém os extratos das amostras. Todas as vezes que se executava uma batelada de ensaio era feito uma curva padrão com uma solução estoque do 17β -estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) em uma concentração de $54,48 \mu\text{g.L}^{-1}$ em etanol (grau HPLC, Tedia®) como controle positivo, assim como sua diluição seguindo os mesmos procedimentos para os extratos das amostras.

Na placa de análise, intercalou-se uma fileira para amostra e uma para o branco. Além disso, a cada batelada de ensaios a solução estoque do 17β -estradiol foi intercalada com o branco em duplicata (Figura 5 e 6). As placas foram seladas com fita crepe levadas ao agitador (IKA, MS-3) e em seguida incubadas por 72 horas a 30°C em uma estufa. A leitura da placa foi realizada no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI) na UERJ em um espectrofotômetro de 96 poços (Softmax Pro 5, SpectraMax M3) nos comprimentos de onda de 575 nm, para cor, e 620 nm, para turbidez. Ao término da leitura, as placas, assim como todo o material que entrou em contato com a levedura foram autoclavados a 121°C por 15 min para então serem descartados.

Figura 5 - Placa de análise intercalando o controle positivo, o branco e a amostra

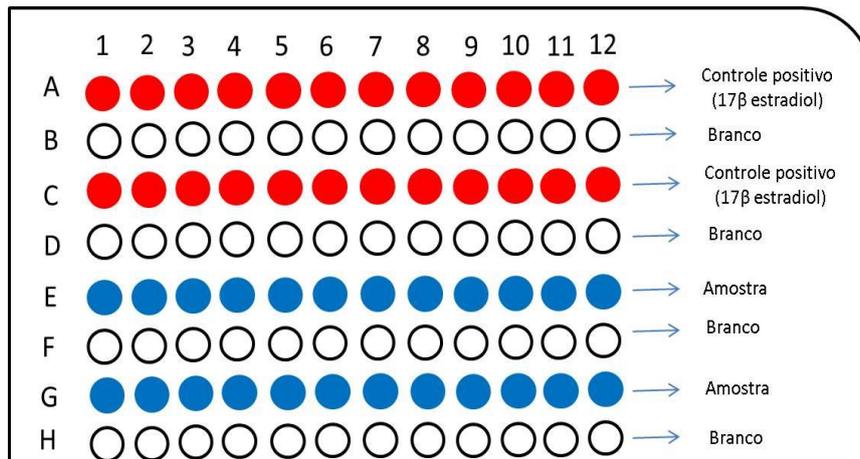


Figura 6 - Foto da placa de análise no ensaio YES após 72 horas de incubação



3.5.7 Análise dos dados do ensaio YES

Após a leitura da absorbância foi possível calcular a absorbância corrigida (Abs_{corr}) das amostras em cada poço da placa para em seguida construir as curvas dose-respostas do ensaio. Para isso utilizou-se a equação 1,

$$Abs_{corr} = Abs_{575 Amostra} - (Abs_{620 Amostra} - Abs_{620 Branco}) \quad (1)$$

Onde:

$Abs_{575 \text{ Amostra}}$ representa a absorvância da amostra usando comprimento de onda de 575 nm para aferição da estrogenicidade.

$Abs_{620 \text{ Amostra}}$ representa a absorvância da amostra usando comprimento de onda de 620 nm para quantificar a inibição do crescimento da levedura.

$Abs_{620 \text{ Branco}}$ representa a absorvância do branco usando comprimento de onda de 620 nm. Construiu-se a curva dose-resposta no programa Origin®6.0 pela correlação entre os valores de absorvância corrigida em cada poço e as concentrações de cada um em escala logarítmica. A concentração do composto que elucida 50% da atividade estrogênica corresponde aos valores calculados de CE_{50} . Tanto para o 17 β -estradiol quanto para as substâncias padrões, o CE_{50} foi expresso em $ng.L^{-1}$. Para o cálculo da concentração de equivalente de 17 β -estradiol (EQ-E2) nas amostras, ou seja, a concentração desse estrogênio necessária para elucidar a mesma resposta na amostra do ensaio YES utilizou-se a equação 2:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (2)$$

Onde: A_1 representa a máxima indução da atividade estrogênica (β galactosidade); A_2 é a mínima indução, ou seja, o limite de detecção; y é o valor de $Abs_{corr \text{ Amostra}}$; x significa a concentração da substância estrogênica no ensaio; x_0 é o valor do CE_{50} e p é a inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta (BILA, 2005). Para obter o valor real da EQE2 da amostra, finaliza-se o cálculo dividindo o valor resultante da fórmula pelo fator de concentração utilizado na extração em fase sólida. A potência relativa foi determinada para avaliar o potencial estrogênico das amostras comparando-as ao controle positivo 17 β estradiol, para isso, utilizou-se a equação 3:

$$PR = \frac{CE_{50} (17\beta\text{estradiol})}{CE_{50} (\text{amostra})} \quad (3)$$

A interpretação do valor resultante da equação da potência relativa baseia-se no preceito: se o valor da PR for maior que 1 a substância em análise possui maior

estrogenicidade do que o controle positivo (17 β -estradiol), se for menor que 1, possui menor estrogenicidade (SILVA, 2015).

É possível que os compostos presentes na amostra analisada causem toxicidade e inibam o crescimento da levedura utilizada no ensaio, se isso acontecer, o fundo dos poços da placa apresentará ausência de turbidez, significando que ocorreu toxicidade, dessa forma, os poços subsequentes eram avaliados até que a inibição não fosse mais observada. Para o cálculo da toxicidade utilizou-se a equação 4 apresentada por Frische e colaboradores (2009):

$$\text{Toxicidade} = 1 - \left(\frac{\text{Abs}_{620} \text{ amostra}}{\text{Abs}_{620} \text{ branco}} \right) \quad (4)$$

Onde: Abs_{620 (amostra)} representa a média da absorbância a 620 nm de cada poço das amostras em duplicata, por exemplo, o valor da Abs₆₂₀ nm no primeiro poço da fileira A somado ao valor da Abs₆₂₀ nm do primeiro poço da fileira C dividido por 2. E assim sucessivamente nos outros poços e nas outras fileiras que contenha amostras. O Abs_{620 (branco)} considera a média dos 24 poços, pois representa a média da absorbância a 620 nm nas duas linhas que apresentam os valores do branco referentes a amostra analisada em duplicata.

Se o resultado for igual ou menor que zero, significa que não houve toxicidade, ou seja, a levedura pode ter crescido igualmente na amostra e no branco ou mais na amostra do que no branco. Caso contrário, se o resultado for maior que zero, houve toxicidade e a levedura cresceu menos na amostra do que no branco. Se a amostra apresentar toxicidade será necessário a diluição da mesma, se a amostra não apresentou resposta estrogênica e não deu toxicidade, provavelmente ela não apresenta compostos estrogênicos (SILVA, 2015).

3.6 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.6.1 Aparatos e condições da cromatografia

As análises por cromatografia líquida foram realizadas em um cromatógrafo da marca Waters Corporation® composto por um amostrador automático; detector Diode Array (DAD); detector de fluorescência (FLU); forno para coluna cromatográfica; redutor de pulso; bomba binária com 2 pistões. A metodologia utilizada para detecção e quantificação dos compostos estrogênicos seguiu o trabalho desenvolvido por Oliveira (2015) empregando a coluna cromatográfica Novapak PAH (4,6 x 250 mm, 5 microns), e modificado para condições de eluição em modo gradiente, utilizando como fase móvel água ultra pura (H₂O) e acetonitrila (ACN) nas seguintes condições cromatográficas: fluxo de 1 mL.min⁻¹, iniciando na proporção 40:60 (ACN:H₂O), alterando para 50:50 em 6 min e, em seguida, para 30:70 ao longo de 9 min, sendo esta última proporção mantida até 13 min, retornando em seguida para 40:60, mantendo nesta proporção até 15 min. A introdução da amostra foi em modo automático com volume de 20µL. Para a detecção em fluorescência utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 180 nm e de emissão de 360 nm. A temperatura no compartimento termostático da coluna cromatográfica foi fixada em 30⁰C.

Durante a etapa de extração os analitos de interesse foram concentrados, após análise no CLAE as concentrações na amostra foram calculadas pela equação 5.

$$[Ei] = \frac{R \times V_{res.}}{V_{extr.}} \quad (5)$$

Onde:

[E] representa a concentração da amostra,

R a resposta obtida pelo cromatógrafo

V_{res} o volume de ressuspensão (mL) e

V_{ext.} o volume de amostra usado na EFS (mL).

3.6.2 Preparo da curva analítica

O preparo da curva analítica se deu pela injeção de um mix padrão contendo, aproximadamente, 50 µg/L de cada estrogênio. Foram feitas cinco diluições pelo amostrador, através do método “partial loop” em modo “needle overfill”, onde, a seringa do amostrador aspira um volume pré-determinado, conforme mostra a Tabela 3 e completa o volume do loop (20µL) com o mesmo solvente utilizado para o preparo da solução padrão.

Tabela 3 - Concentrações teóricas dos estrogênios na curva de calibração.

Volume (µL)	E2 (µgL⁻¹)	EE2(µgL⁻¹)	E3(µgL⁻¹)
20	53	66,5	50
16	42,4	53,2	40
8	21,2	26,6	20
4	10,6	13,3	10
3	7,95	9,975	7,5

Os parâmetros para validação de métodos analíticos devem incluir, dentre outros, faixa de linearidade e sensibilidade do método (limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)) (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010). Para este trabalho, foram determinados a linearidade, o LD e o LQ do método cromatográfico desenvolvido, onde: a linearidade é a capacidade que uma metodologia tem em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na solução, dentro de um intervalo especificado; o LD mede a menor concentração do analito que o método pode detectar; e o LQ corresponde ao padrão de calibração de menor concentração que pode ser quantificado pelo método analítico.

Para a estimativa desses parâmetros de validação, foi utilizada uma planilha desenvolvida por Ribeiro et al., 2008.

3.6.3 Teste de recuperação da EFS

Para avaliar a eficiência do processo de extração foram preparadas amostras de esgoto sintético seguindo a metodologia descrita em NASCENTES (2013). Para realizar três ensaios em triplicata, preparou-se 13 litros de esgoto sintético, sendo 1 litro sobressalente para repor possíveis perdas. O preparo se deu a partir da mistura de água da rede com as quantidades dos reagentes apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do esgoto sintético preparado para a realização do estudo de recuperação.

Compostos	Concentração (g/L)
Peptona de casein	4,68
Extrato de carne	3,33
Ureia	1,29
Fosfato monobásico de potássio	0,338
Cloreto de sódio	0,182
Cloreto de cálcio di-hidratado	0,104
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	0,052

As amostras de esgoto sintético foram armazenadas em frascos âmbar de 1 litro, dopadas com diferentes concentrações da solução mix de estrogênios (solução padrão de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Tabela 5):

Tabela 5 - Concentrações dos padrões de E2, EE2 e E3 nas amostras de esgoto sintético.

Padrões	Concentração (ngL^{-1})		
E2	4,2	10,6	16,6
EE2	5,3	13,3	20,9
E3	4	10	15,7
Branco	0	0	0

Em seguida as amostras dopadas foram filtradas e extraídas no cartucho Strata X (Phenomenex® de 500mg/6mL) seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras de esgoto bruto e efluente de ETE (Item 3.4.1 e 3.4.2).

3.7 Caracterização físico-química das amostras de esgoto bruto e efluente de ETE e correlação de Spearman

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da UERJ. Para as amostras coletadas na ETE foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH, turbidez, SDT, SST, carbono orgânico dissolvido, nitrogênio amoniacal e fósforo total. A Tabela 6 apresenta os parâmetros físico-químicos analisados com as respectivas metodologias descritas em APHA (2012):

Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos analisados nas amostras de esgoto bruto e tratado e respectivas metodologias de acordo com o APHA (2012)

Parâmetro	Equipamento	APHA,2012
pH	pHmetro	Método 4500 – H ⁺ B
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Digestor de DQO e espectrofotômetro	Método 5220D
Turbidez	Turbidímetro	Método 2130B
SDT / SST	Bomba de vácuo, estufa, mufla, balança analítica e aparatos de filtração	Métodos 2540C, 2540D
Carbono orgânico dissolvido	TOC – V CPN Shimadzu, aparatos de filtração e bomba a vácuo	Método 2120D
Nitrogênio amoniacal	Eletrodo íon-seletivo de amônia	Método 4500- NH ₃ D
Fósforo total	Placa de aquecimento e espectrofotômetro	Método 4500- P E

Para avaliar o nível de correlação entre os parâmetros DQO, Carbono orgânico dissolvido e turbidez e as concentrações dos estrogênicos detectadas pela cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se o teste estatístico de correlação de *Spearman*. Este coeficiente é conhecidamente utilizado para variáveis mensuráveis em nível ordinal e é

representado pela letra grega ρ (rho) (LIRA e NETO, 2006). Esse teste correlaciona duas variáveis com o objetivo de verificar se há índice de monotonicidade, ou seja, quando houver correlação positiva o aumento do valor de X corresponderá ao aumento do valor de Y, quando houver correlação negativa, o aumento do valor de X corresponderá a redução do valor de Y (LIRA e NETO, 2006). Para o cálculo da correlação de *Spearman*, utilizou-se a equação 6

$$\hat{\rho}_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

(6)

Onde:

ρ é o coeficiente de correlação de Spearman

d^2 é a diferença entre as ordenações

n é o número de pares de ordenações

O resultado deve estar no intervalo entre -1 e 1, onde -1 indica uma correlação negativa e 1 indica uma correlação positiva.

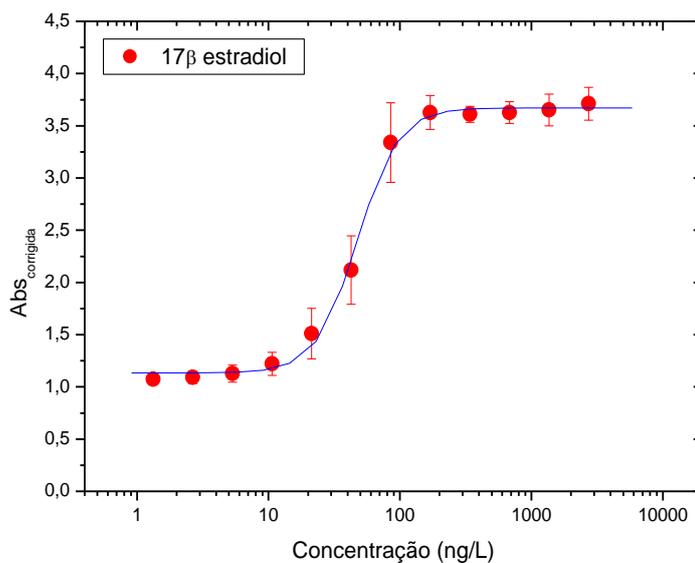
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio YES

4.1.1 Controle positivo 17 β estradiol

Durante a realização de cada ensaio determinou-se uma curva dose-resposta do 17 β -estradiol produzida na faixa de 2724 a 1,33 ng.L⁻¹ (Figura 7). O limite de detecção do ensaio foi de $10,13 \pm 3,65$ ng. L⁻¹.

Figura 7 - Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol no ensaio YES



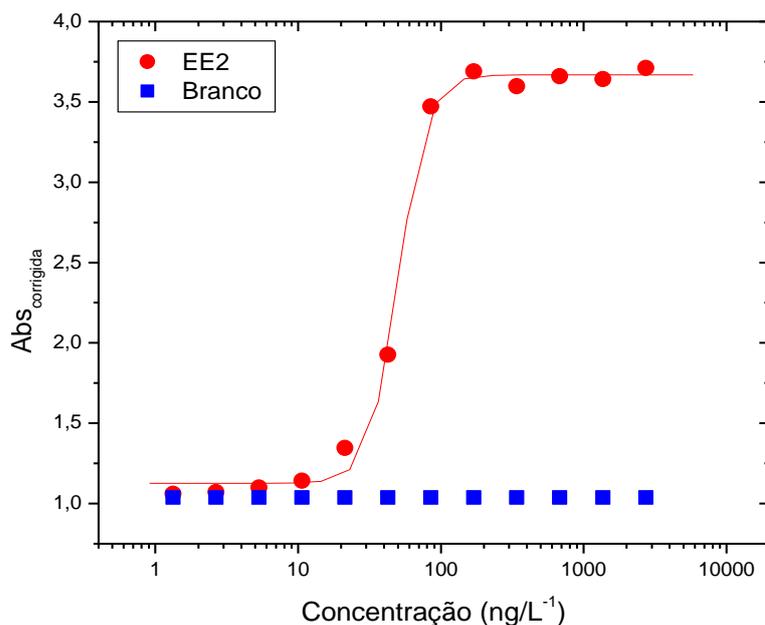
Os ensaios *in vitro* YES realizados com o controle positivo resultaram em um valor médio de CE₅₀ de $48,3 \pm 9,6$ ng.L⁻¹ próximo ao encontrado por outros autores Ferreira (2008), Beck e colaboradores (2006) Fic e colaboradores (2014) que Balsiger e colaboradores (2010) encontrado por Rutishauser e colaboradores (2004).

4.1.2 Determinação da atividade estrogênica dos padrões de EE2, E1 e E3

- 17 α – etinilestradiol (EE2)

Utilizou-se a faixa de concentração de 2724 a 1,33 ng.L^{-1} para a determinação da curva dose-resposta do 17 α -etinilestradiol, a mesma utilizada para a curva do controle positivo 17 β -estradiol (Figura 8). O valor encontrado para o CE_{50} foi 50,2 ng.L^{-1} , próximo a 53,3 ng.L^{-1} encontrado por Rutishauser e colaboradores (2004). Considerando o potencial estrogênico do 17 β -estradiol igual a 1, o potencial do 17 α -etinilestradiol foi levemente inferior ao do controle positivo obtendo uma potência relativa de 0,96, próximo ao detectado Van der Belt e colaboradores (2004), Ferreira (2008) e Beck et al., (2006).

Figura 8 - Curva dose-resposta do composto 17 α -etinilestradiol na faixa de concentração 2724 a 1,33 ng.L^{-1} no ensaio YES

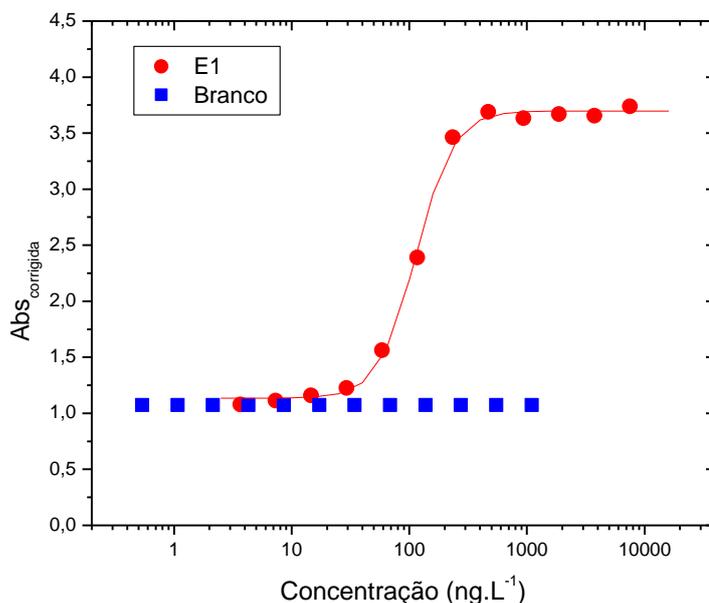


- Estrona (E1)

Para a determinação da curva dose-resposta da estrona no ensaio YES utilizou-se a faixa de concentração de 7500 a 3,662 ng.L^{-1} (Figura 9). O valor encontrado para o

CE_{50} foi de 114 ng.L^{-1} e obtendo uma potência relativa no valor de 0,42 mostrando que a estrona também apresenta menor potencial estrogênico em relação ao 17β estradiol Rutishauser et al., (2004), Beck et al., (2006) e Murk et al., (2002) encontraram, respectivamente, 0,38, 0,25 e 0,1 para a potência relativa da estrona, todos realizaram ensaios com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, utilizando receptor de estrogênio como via de sinalização.

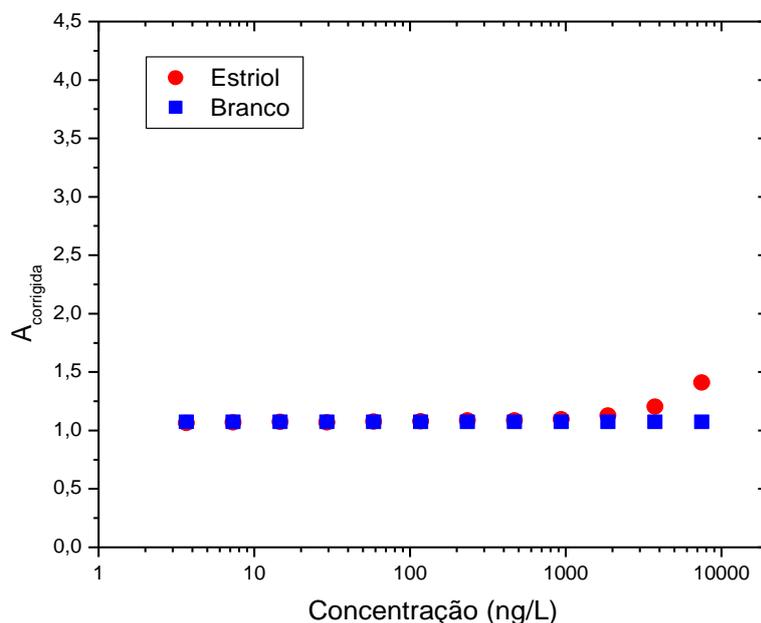
Figura 9 - Curva dose-resposta do composto estrona na faixa de concentração 7500 a $3,66 \text{ ng.L}^{-1}$ no ensaio YES



- Estriol (E3)

Realizou-se o ensaio YES para determinação da curva dose-resposta do estriol utilizando a faixa de concentração de 7500 a $3,62 \text{ ng.L}^{-1}$ (Figura 10), no entanto, essa concentração não foi suficiente para gerar a curva sigmoide. Segundo Finney (1965) e Villeneuve e colaboradores (2000), para haver confiabilidade na comparação entre a curva dose-resposta dos padrões com o controle positivo e para que a PR e o valor de CE_{50} sejam calculados é necessário que a curva apresente um paralelismo.

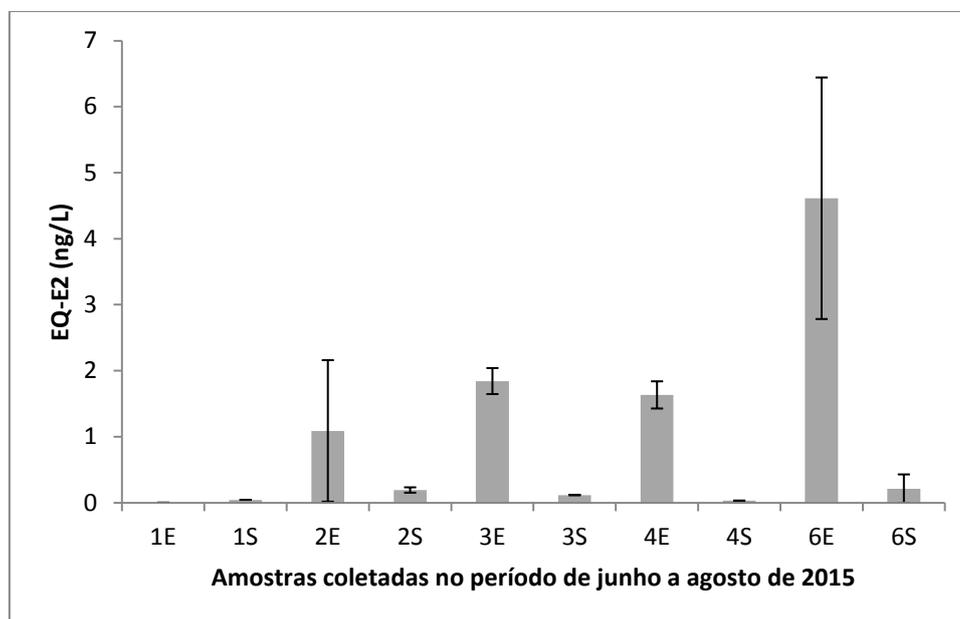
Figura 10 - Curva dose-resposta do composto estriol no ensaio YES na faixa de concentração 7500 a 3,62 ng.L⁻¹ no ensaio YES



4.1.3 Determinação da atividade estrogênica das amostras

Apenas uma amostra, a 1E, dentre as 10 analisadas não apresentou atividade estrogênica. A média dos valores de EQE₂ nas amostras de esgoto bruto variou de 1,08 a 4,61 ng.L⁻¹. Para as amostras de esgoto tratado a média do EQE₂ encontrada variou de 0,02 a 0,2 ng.L⁻¹. Outros autores que trabalharam com efluentes de ETE encontraram variações das concentrações consideravelmente maiores, como 34,1 - 65,96 ng.L⁻¹ (PAWLOWSKI et al., 2004) e 0,5 - 100 ng.L⁻¹ (RUTISHAUSER et al., 2004). A Figura 11 apresenta os valores médios encontrados para o equivalente estradiol (EQ-E2) nas amostras de esgoto bruto e efluente de ETE. As curvas dose-respostas das amostras analisadas encontram-se no Apêndice 1.

Figura 11 - Valores médios de equivalente estradiol (EQ-E2) obtidos no ensaio YES das amostras de esgoto bruto e efluente de ETE coletados no período de junho a agosto de 2015



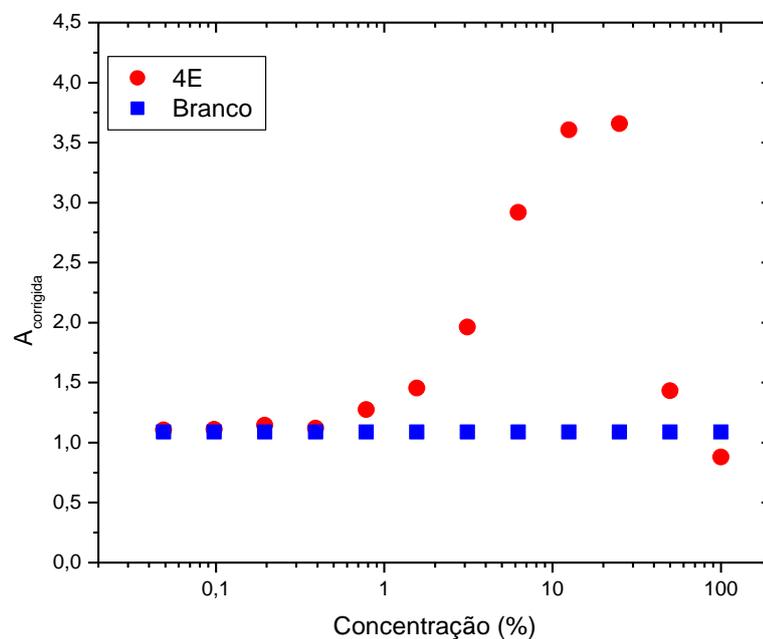
Um dos possíveis motivos para a amostra 1E não ter apresentado atividade estrogênica no esgoto bruto mas sim no esgoto tratado é a possibilidade do tratamento convencional ter retirado alguns compostos capazes de interferirem na análise pelo ensaio YES, e que atuariam como antagonistas, inibindo a atividade estrogênica (KOLLE et al., 2010). Esses compostos podem bloquear o receptor de estrogênio da levedura impedindo que a substância estrogênica, presente na amostra, se ligue, ou seja, impossibilitando que uma resposta estrogênica seja expressa no ensaio ainda que a amostra apresente estrogenicidade (KOLLE et al., 2010). Outra possibilidade é o tempo de retenção do esgoto a ser tratado na ETE, ou seja, apesar das amostras terem sido coletadas no mesmo dia, não necessariamente a amostra de esgoto tratado é referente à amostra de esgoto bruto que foi coletada.

4.1.4 Toxicidade nas amostras de esgoto bruto e efluente de ETE no ensaio YES

A inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no ensaio YES é proveniente da presença de toxicidade na amostra. A toxicidade foi determinada no primeiro poço da placa, considerado a amostra 100% concentrada.

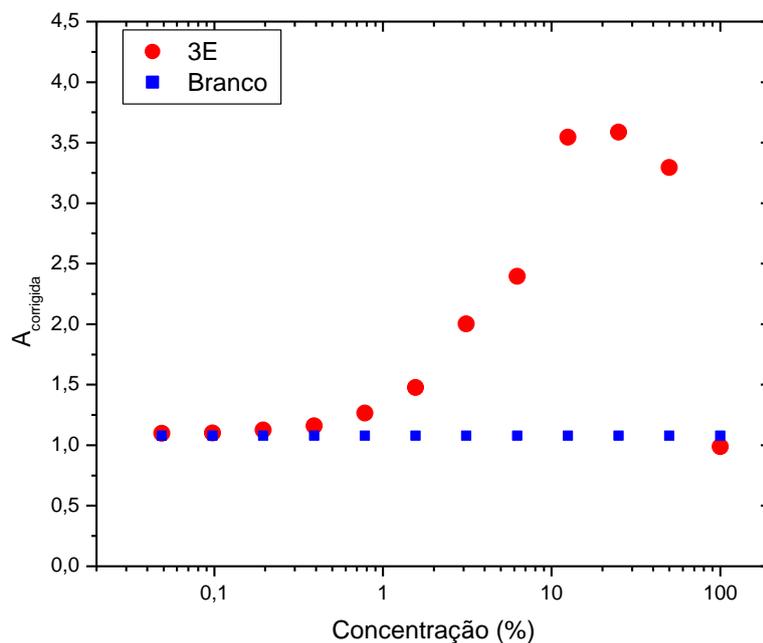
Dentre as amostras de esgoto bruto, a que apresentou maior toxicidade foi a 4E, tendo 92% de inibição da levedura no primeiro poço seguido de 72% no segundo poço e apenas no terceiro poço não houve mais inibição. Embora apenas 3, dentre as 10 amostras coletadas tenham apresentado toxicidade, segundo Bistan e colaboradores (2011) este comportamento é frequentemente percebido quando se analisa amostras extraídas de efluente de esgoto sanitário. A curva dose-resposta dessa amostra também demonstrou essa toxicidade (Figura 12):

Figura 12 - Curva dose-resposta da amostra de esgoto bruto 4E no ensaio YES.



Outra amostra que também apresentou uma considerável toxicidade foi a 3E tendo 87% de inibição da levedura na amostra 100% concentrada, porém no poço seguinte não houve mais inibição (Figura 13).

Figura 13 - Curva dose-resposta da amostra de esgoto bruto 3E no ensaio YES.



Dentre as amostras de esgoto tratado, somente a amostra 1S apresentou inibição no crescimento da levedura apresentando 5% de toxicidade, porém no poço subsequente a toxicidade não foi mais observada. A estimativa da toxicidade de todas as amostras está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Estimativa da toxicidade das amostras de esgoto bruto e tratado coletadas na ETE no ensaio YES

		Concentração da amostra no poço na placa de		
		96 poços		
Nome da amostra		100%	50%	25%
Esgoto bruto	1E	-0,17	*	*
	2E	-0,03	*	*
	3E	0,87	-0,04	*
	4E	0,92	0,72	-0,21
	6E	-0,20	*	*
	1E	0,05	-0,01	*

Esgoto tratado	2E	-0,08	*	*
	3E	-0,06	*	*
	4E	-0,01	*	*
	6E	-0,09	*	*

(*) Toxicidade não observada

4.2 Caracterização físico química das amostras de esgoto bruto e efluente de ETE e correlação de Spearman

Os resultados da caracterização físico-química das amostras de esgoto bruto e efluente de ETE encontram-se na Tabela 8. Foram realizadas amostragens simples em cada ponto, não respeitando o tempo de detenção hidráulica da ETE.

Tabela 8 - Resultados dos parâmetros físico-químicos de todas as amostras coletas na entrada e na saída.

Esgoto tratado				
Parâmetros	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
pH	2,7	5,9	4,4	1
DQO (mg.L ⁻¹)	11	29	20,1	5,3
Turbidez (NTU)	0,17	13,5	3,3	4,6
SST (mg.L ⁻¹)	0	64	19,6	22,7
COD (mg.L ⁻¹)	4	18,7	9,1	4,3
Nitrogênio amoniacal(mg.L ⁻¹)	0,3	2,4	1,16	0,8
Fósforo total(mg.L ⁻¹)	0,08	1,8	1,35	0,6
Esgoto bruto				
Parâmetros	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
pH	6,6	7,8	7,1	0,3
DQO (mg.L ⁻¹)	15	584	213,6	186,3
Turbidez (NTU)	7,7	88	44,3	27,5
SST (mg.L ⁻¹)	2	168	60	54,3
COD (mg.L ⁻¹)	15	174	44,6	48
Nitrogênio amoniacal(mg.L ⁻¹)	12	32	19,7	5,6
Fósforo total(mg.L ⁻¹)	0,7	2	1,6	0,3

4.3 Quantificação das concentrações de estrogênios por cromatografia líquida de alta eficiência

O limite de quantificação (LQ) do método obtido para o E3 foi 3,71 µg/L e o limite de detecção (LD) 2,51 µg/L. Para o E2, obteve-se o LD de 1,44 µg/L e LQ de 2,12 µg/L e finalmente, para o EE2 um LD de 4,9 µg/L e LQ de 7,2 µg/L. Os valores do coeficiente de correlação (R^2) foram acima de 0,90 demonstrando linearidade, segundo os parâmetros estabelecidos pelo INMETRO (2010). O tempo de retenção e a equação da reta também podem ser observados na Tabela 9 e as curva analíticas dos estrogênios nos Apêndice 2, 3 e 4.

Tabela 9 - Equação da reta, coeficiente de correlação e tempo de retenção para os três estrogênios obtidos em uma mesma corrida cromatográfica.

Estrogênio	Coeficiente de correlação (R^2)	Tempo de Retenção (min.)	Equação da reta
E3	0,996	3,951	$y = 6,21 \times 10^4 x - 4,27 \times 10^4$
E2	0,998	7,806	$y = 4,15 \times 10^4 x - 2,87 \times 10^4$
EE3	0,996	3,951	$y = 3,92 \times 10^4 x - 9,6 \times 10^4$

A Tabela 10 apresenta a média das concentrações de cada estrogênio encontrada nas amostras de esgoto bruto e tratado.

Tabela 10 - Concentrações dos estrogênios encontrados nas amostras de esgoto bruto e tratado coletadas da ETE no período de junho a dezembro de 2015.

Esgoto bruto			
Nome da amostra	E3	E2	EE2
1E	1,871 µg/L	*	*
2E	5,151 µg/L	*	*
3E	1,916 µg/L	*	*
4E	2,437 µg/L	*	*
5E	*	*	*
6E	2,528 µg/L	*	*

7E	7,136 µg/L	0,644 µg/L	0,224 µg/L
8E	4,298 µg/L	*	*
9E	0,261 µg/L	*	*
10E	0,367 µg/L	*	*
Esgoto tratado			
Nome da amostra	E3	E2	EE2
1S	2,194 µg/L	*	*
2S	0,642 µg/L	*	*
3S	0,665 µg/L	*	*
4S	0,549 µg/L	*	0,082 µg/L
5S	0,591 µg/L	*	0,062 µg/L
6S	0,117 µg/L	*	*
7S	0,275 µg/L	*	0,564 µg/L
8S	0,290 µg/L	*	*
9S	0,481 µg/L	*	0,049 µg/L
10S	3,150 µg/L	*	*

(*) não detectado

Considerando as concentrações necessárias para um estrogênio causar danos aos organismos e baseado no trabalho de Metcalfe e colaboradores (2001), nove dentre as vinte amostras coletadas apresentam concentrações de E3 que poderiam causar edema em alguns órgãos de peixes da espécie *Oryzias latipes* (Medaka) e hermafroditismo, ainda, todas as concentrações do EE2 encontradas seriam tóxicas para essa espécie. Cinco, dentre as sete concentrações detectadas de EE2 seriam capazes de provocar atraso na gametogênese de peixes da espécie *Danio rerio* (HILL e JANZ, 2003).

Comparando as concentrações de E2 encontradas por esse trabalho em esgoto tratado de ETE com as encontradas por Souza (2011) (4,0 e 3,4 µg/L) detectou-se uma concentração relevantemente menor do que as encontradas por eles. Em contrapartida, para a amostra de esgoto tratado a concentração de E2 encontrada foi superior as encontradas por Pessoa (2012) (0,01128 (LD)- 0,21 µg/L e 0,01128 (LD) – 0,5 µg/L). Todas as concentrações encontradas de EE2 foram inferiores as encontradas por Ghiselli (2006) em esgoto bruto e tratado de uma ETE de São Paulo e Souza (2011) no Ceará.

A análise da correlação de *Spearman* permitiu observar que existe uma correlação positiva entre DQO, COT e turbidez e as concentrações dos estrogênios, pois todos os valores obtidos foram positivos (Tabela 11). Desta forma, quanto maior os valores desses parâmetros, maior é a concentração.

Tabela 11 - Resultados do teste de correlação de Spearman entre parâmetros físico-químicos e concentração dos estrogênios em esgoto bruto e tratado.

Par de variáveis	N (amostras)	Correlação de <i>Spearman</i>
DQO x [E3]	19	0,6456
DQO x [EE2]	7	0,4286
DQO x [E2]	2	1
COT x [E3]	19	0,3575
COT x [EE2]	7	0,6071
COT x [E2]	2	1
Turbidez x [E3]	19	0,1860
Turbidez x [EE2]	7	0,4286
Turbidez x [E2]	2	1

5. CONCLUSÃO

No que concerne ao ensaio *in vitro* YES, para além dos resultados e conclusões encontrados por outros autores, após as análises das amostras de esgoto bruto e tratado da ETE foi possível ratificar que esse ensaio atua como uma ferramenta adequada para identificar substâncias com potencial estrogênico. Nas condições do teste, em nove dentre as dez amostras analisadas foi identificado a presença de substâncias desreguladoras endócrinas, a única que não apresentou resposta estrogênica não demonstrou toxicidade. Embora essas três amostras mencionadas sejam de esgoto bruto, é imprescindível que haja estudos complementares para propor a implementação de tratamentos eficazes visto que os processos convencionais existentes nas ETEs não são eficientes para a remoção dessas substâncias.

Embora o estrogênio detectado com maior frequência tenha sido o estriol, a cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se satisfatória para determinar e quantificar os estrogênios presente nas amostras de esgoto bruto e tratado, mostrando elevados níveis de concentração dos mesmos. Apenas uma dentre as 7 amostras em que se detectou o 17 α -etinilestradiol encontrou-se concentrações menores que 1 ng.L⁻¹. Esse fato é alarmante, visto que segundo a literatura, uma concentração de 1 ng.L⁻¹ de EE2 é suficiente para causar efeitos nocivos aos organismos expostos a essas substâncias. O E2 apresenta maior estrogenicidade que o EE2, portanto, possivelmente, uma concentração menor que 1 ng.L⁻¹ seria suficiente para causar algum dano ao sistema endócrino dos organismos. O E3 e o E1 apesar de apresentarem menor estrogenicidade quando comparados ao E2, há de considerar o efeito sinérgico das substâncias que acentuaria o efeito causado. Portanto, além da importância de mais estudos voltados para a implementação de tratamentos eficazes buscando alcançar a remoção desses micropoluentes em ETEs, salienta-se a necessidade de integrar o ensaio *in vitro* YES com técnicas analíticas complementares, como os ensaios *in vivo*, que possibilitem uma maior compreensão sobre os efeitos dessas substâncias presentes na matriz ambiental estudada.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar teste de recuperação em amostras ambientais e sintéticas de modo a comparar a interação ou interferência que possa ocorrer destas como os compostos de interesse;

Propõe-se que o método de extração em fase sólida seja realizado com dois cartuchos sequencias, o Strata SAX, ou equivalente, e o Strata X, ou equivalente, de modo a avaliar a melhor remoção de compostos interferentes, como os surfactantes aniônicos e seus produtos de degradação, ou outros que possa a vir a interferir no processo de extração.

Realizar os testes de recuperação utilizando um padrão Surrogate para melhor avaliação da porcentagem de recuperação e utilização de padrão interno como método de correção de desvios que possam ocorrer devido ao efeito matriz.

No que diz respeito a realização do ensaio *in vitro* YES para determinação da curva dose-resposta do estriol, recomenda-se a realização de um novo ensaio com uma faixa de concentração maior que 7500 a 3,62 ng.L⁻¹ afim de que a curva apresente paralelismo e então haja confiabilidade na comparação entre a curva dose-resposta desse padrão e o controle positivo.

REFERÊNCIAS

- APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th edição. 1360 f., 2012.
- AURIOL, M. et al. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 3, p. 525-539, 2006.
- ANVISA. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio. Brasil: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, 2003.
- BALSIGER, H, A. et al. A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. *Science of the Total Environment*, v. 408, p.1422–29, 2010.
- BECK, I.-C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, v. 63, p. 1870-78, 2006.
- BERESFORD, N. et al. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 162, n. 1, p. 22-33, 2000.
- BHANDARI, A. et al. Contaminants of Emerging Environmental Concern. *American Society of Civil Engineers*, 2009.
- BILA, D. M. *Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -Estradiol pelo Processo de Ozonização*. 2005. 218 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/COOPE, Rio de Janeiro, 2005.
- BISTAN, M. et al. Yeast Estrogen Screen Assay as a tool for detecting estrogenic activity in water bodies. *Food Technol. Biotechnol.* p. 427–433, 2012.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v. 30, p. 651-666, 2007.
- BRASIL, Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 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*. 12 dez. 2011.
- BRASIL, 2005a. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. 18 mar. 2005. p. 58-63.
- BRASIL, 2005b. Decreto nº 5472, de 20 de junho de 2005. Promulga o texto da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, adotada, naquela cidade, em 22 de maio de 2001.

- BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. *Sistema Nacional de Informações sobre saneamento: diagnóstico dos serviços de água e esgoto*. 2014. Brasília: SNSA /MCIDADES, 2016. p.212
- BROWN, K. et al. Reduced embryonic survival in rainbow trout resulting from paternal exposure to the environmental estrogen 17 α -ethynylestradiol during late sexual maturation. *Reproduction*. v.134, p. 659–666, 2007.
- BRIX R. et al. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environ Int*. p. 361-367, 2010.
- CARSON, R. *Primavera silenciosa*. Tradução de Claudia Sant’anna Martins. São Paulo: GAIA, 2010.
- CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise instrumental. Interciência, Ed. Rio de Janeiro, 2000.
- CLARA, M. et al. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res*, v.39, 2005.
- CLARA, M. et al. Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere*, v. 56, p. 843-851, 2004.
- COLEMAN, H. M. et al. “Rapid Loss of Estrogenicity of Steroid Estrogens by UVA Photolysis and Photocatalysis over an Immobilised Titanium Dioxide Catalyst”, *Water Research*, v. 38, p. 3233-3240, 2004.
- CORDEIRO, D. *Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto*. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 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.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 21-25, 1998.
- DIETRICH, S. et al. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. *Chemosphere*, v. 79(1), p.60–66, 2010.
- DIAS, A.C.V. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and environmental safety*, p. 41-47, 2015.
- DOLAR, D. et al. Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. *J Hazard Mater*, 2012.
- ECKERT, R. et al. *Fisiologia animal: mecanismos e adaptações*. Rio de Janeiro, 729 p. ISBN 978-85-277-0594-3, 4ª Ed, 2008.

EPA. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, U.S. *Environmental Protection Agency*, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington D. C, 1997.

FERREIRA, M.G.M. *Remoção da atividade estrogênica de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂*. 2008. 173 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FIC, A. et al. Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere*, v. 112, p. 362–369, 2014.

FILHO, R.W.R.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E.M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, p. 283-288, 2007.

FINNEY, D. J. The Meaning of Bioassay. *Biometrics*, v.21, n.4, p. 785-798, 1965

FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environmental Science Pollution Research*, v. 16, p. 593-603, 2009.

GEROLIN, E.R.R. *Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré*. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, v. 30, p. 695-706, 2007.

HENRIQUES, M.L.G.D. *Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: otimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS*. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade de Lisboa, 2008.

HILL, L. Jr.; JANZ, D.M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquat. Toxicol.*, v. 63, p.417-429, 2003.

HYNDMAN, K.M. et al. Assessing the effects of exposure timing on biomarker expression using 17b-estradiol. *Aquat. Toxicol.* v.96, p.264-272, 2010.

IBGE, 2010. Brazilian Institute of Geography and Statistics. *Census 2010*, Rio de Janeiro, Brazil.

INMETRO. *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. 3. ed. [S.l.]: Coordenação Geral de Acreditação, 2010. DOQ-CGCRE-008.

IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY REPORT. Global assessment of the: state of the science of endocrine disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2, *World Health Organization* (WHO), Geneva, Switzerland. 2002.

JAROSOVÁ, B. et al. What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ. Int.* v. 64, p. 98–109, 2014.

KANDA, R.; CHURCHLEY, J. Removal of endocrine disrupting compounds during conventional wastewater treatment. *Environmental Technology*, v. 29, p. 315-323, 2008.

KOIFMAN, S.; PAUMGARTTEN, F.J.R. O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*, p. 354-355, 2002.

LARSSON, D.G.J. et al. Ethinyloestradiol—an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol*, 1999.

LEITE, G. 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.

LEI, Y. et al. Effects of estrone on the early life stages and expression of vitellogenin and estrogen receptor genes of Japanese medaka (*Oryziaslatipes*). *Chemosphere* 93, p. 1104-1110, 2013.

LIMA, D.R.S. *Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos de águas naturais por clarificação associada à adsorção em carvão ativado em pó*. 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

LIRA, S.A.; NETO, A.C. Coeficientes de correlação para variáveis ordinais e dicotômicas derivados do coeficiente linear de Pearson. *RECIE*, v. 15, n. 1, p. 45-53, 2006.

LU, G.H.; YAN, Z.H.; WANG, Y.H. CHEN, W. Assessment of estrogenic contamination and biological effects in Lake Taihu. *Ecotoxicology*, v.20, p.974-981, 2011.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T. A.; BONERZ, M.; RASTALL, A. C.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 129–138, 2004.

PEREIRA, R. de O. *Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação utilizando cloro e ozônio em água*. 2011. 192 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RAIMUNDO, C. C. M. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia*. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RIBEIRO, F.A. L.; FERREIRA, M.M.C. Planilha de validação : uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*, v.31, n.1, p. 164-171, 2008.

RUTISHAUSER B.V., PESONEN M., ESCHER B.I., et al. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays

and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 857–864, 2004.

MATTHIESSEN, P. et al. Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Sci. Total Environ*, v. 367, p. 616–630, 2006

MATSUMOTO, T. et al. “Survey of Estrogenic Activity in Fish Feed by Yeast Estrogen-Screen Assay”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 139, p. 147–152, 2004.

MEYER, A; SARCINELLI, P.N.; MOREIRA, J.C. Estarão alguns populacionais brasileiros sujeitos a ação de disruptores endócrinos? *Cad Saúde Pública*, 1999.

METCALFE, C. D. et al. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Env. Toxicol. Chem.* v. 20, p. 297–308, 2001.

MILLS, L.J.; CHICHESTER, C.; Review of evidence: are endocrine-disrupting chemical in the aquatic environment impacting fish population? *Science of the Total Environmental*. v. 343, n1, p. 1-34. 2005.

MORTHORST, J.E.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P.; Severe malformations of eelpout (*Zoarcesviviparus*) fry are induced by maternal estrogenic exposure during early embryogenesis. *Marine Environmental Reserch*, v. 113. p. 80-87, 2016.

NASSIF, M.C. et al. Estrógeno versus isquemia cerebral: hormônio feminino como agente neuroprotetor. *Infarma*, vl. 17, p. 57-60, 2005.

NASCENTES, A. L. *Tratamento combinado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico*. 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

NOGUEIRA, J. M. F. “Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitoração dos Sistemas Aquáticos”, *Química*, v. 88, p. 65-71, 2003.

OLIVEIRA, M. M. *Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na Bacia de Jacarepaguá, RJ*. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ- PEAMB, 2015.

ONESIOS, K. M.; Yu, J. T.; BOUWER, E .J., Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation*, v. 20, p. 441 – 466, 2009.

ORN, S. et al. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Daniorerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat. Toxicol.* v.65, p. 397 – 411, 2003.

- OTOMO, J. I. *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na Região do Rio Paraíba do Sul, SP*. 2010. 178f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo 2010.
- PÁDUA, V.L. *Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Projeto PROSAB, Edital 5. Rio de Janeiro: ABES, 2009.
- PAYNE, J. P. et al. Prediction and Assessment of the Effects of Mixtures of Four Xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* v. 108, p. 983-987, 2000.
- PATROLECCO, L. et al. Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchemical Journal*, v. 107, p. 165–171, 2013.
- PAWLOWSKI, S. et al. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 129–138, 2004.
- PARIS, F. et al. Increase serum estrogenic bioactivity in three male newborns with ambiguous genitalia: a potential consequence of prenatal exposure to environmental endocrine disruptors. *Environ. Res*, v.100, p. 39-43, 2006.
- PESSOA, G.P. et al. Análise de remoção de interferentes endócrinos em estações de tratamento de esgotos sanitários. In: 26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, *Anais...* Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2011.
- PESSOA, G.P. *Avaliação de desreguladores endócrinos e do micropoluente colesterol em estações de tratamento de esgoto sanitário*. 2012, 213 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*, v. 24, n.1, p.68-76. 2001.
- RAIMUNDO, C. C. M. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia*. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- REIS FILHO, R. W. *Hormônios Estrógenos no Rio do Monjolinho -São Carlos –SP: Uma avaliação da Problemática dos Desreguladores Endócrinos ambientais*. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo: EESCUSP, São Paulo, 2008.
- REIS FILHO, R. W.; ARAUJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Quim.Nova*, v. 29, p. 817-822, 2006.
- ROUTLEDGE, E.J.; SUMPTER, J.P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast assay. *Environ. Toxicol. Chem.* v.15, p. 241-248, 1996.

ROUTLEDGE, E.J. et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ SciTechnol*, v.32, p. 1559–65, 1998.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Pharmaceuticals and pesticides in reclaimed water: Efficiency assessment of a microfiltration–reverse osmosis (MF–RO) pilot plant. *Journal of Hazardous Materials*, v. 282, p. 165–173, 2015.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endógenos. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*. Porto Alegre, v.2, n.3, p. 18-29, 2001.

SCHMID, T.; GONZALEZ-VALERO, J.; RUFLI, H.; et al., Determination of Vitellogenin Kinetics in Male Fathead Minnows (*Pimephalespromelas*). *Toxicology Letters*, v. 131, p. 65-74, 2002.

SCHLEICHER, A. T. *Remoção de estrona, estradiol, etinilestradiol e bisfenol-A por meio de nanofiltração aplicada ao tratamento avançado de águas para consumo humano*. Brasília: Universidade de Brasília (UNB), 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, 2013.

SETAC – SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY. Endocrine disruptors and modulators. *Technical Issue Paper (TIP)*, Pensacola, 2000.

SERVOS, M.R. et al. 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.

SILVA, E.; RAJAPAKSE, N.; KORTENKAMP, A. Something from Nothing – Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects. *Environmental Science and Technology*, v. 36, p. 1751-1756, 2002.

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

SILVA, G. G. M. Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ - PEAMB, 2015.

SODRÉ, F. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de campinas (SP, Brasil). *Journal of Brazilian Society Ecotoxicology*, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.

STAFIEJ, A.; PYRZYNSKA, K.; REGAN, F. Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 985 – 991, 2007.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; TEW, K. D. Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 56, n. 1, p. 36–44, 2002.

TANAKA, H. et al. "Comparison between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast Assay and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment". *Water Science and Technology*, v. 43, n. 2, p. 125–132, 2001.

UMBUZEIRO, G.A. *Guia de potabilidade para substâncias químicas*. São Paulo: Limiar. 2012.

VAN DEN BELT, K. et al. "Comparative Study on the In Vitro/In Vivo Estrogenic Potencies of 17 β -Estradiol, Estrone, 17 α -Ethinylestradiol and Nonylphenol", *Aquatic Toxicology*, v. 66, p. 183–195, 2004.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57–149, 2003.

VILLENEUVE, D. L.; BLANKENSHIP, A. L.; GIESY, J. P. Derivation and application of relative potency estimates based on in vitro bioassay results. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, n. 11, p. 2835-2843, 2000.

VIRKUTYTE, J. et al. *Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater*. Londres: IWA Publishing, 483 f, 2010.

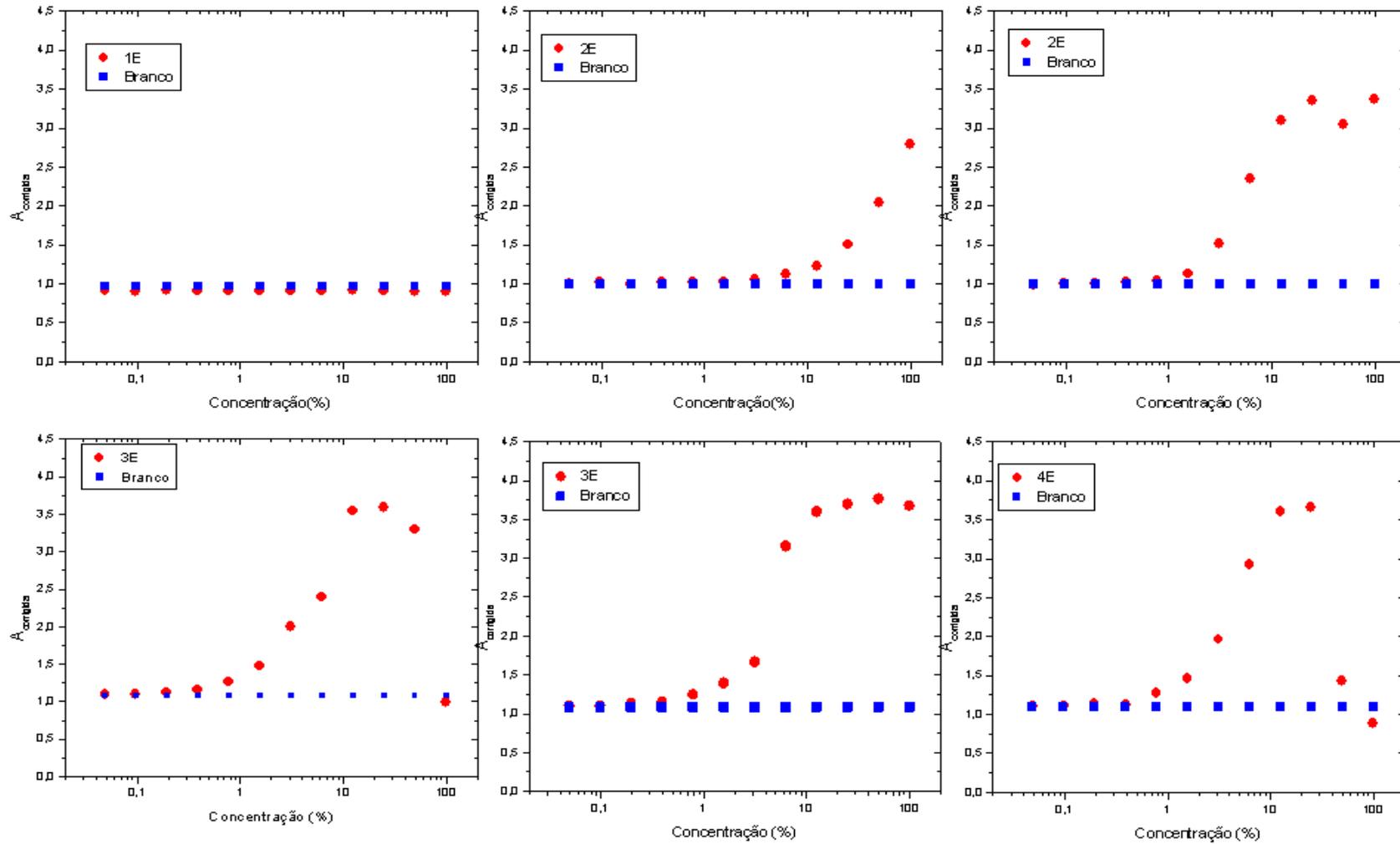
YOON, Y., et al. *Removal of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by nanofiltration and ultrafiltration membranes* *Desalination* v. 202, n. 1, p. 16 - 23, 2007

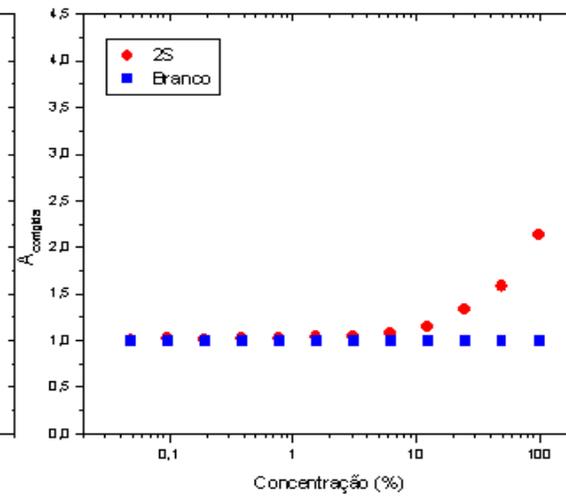
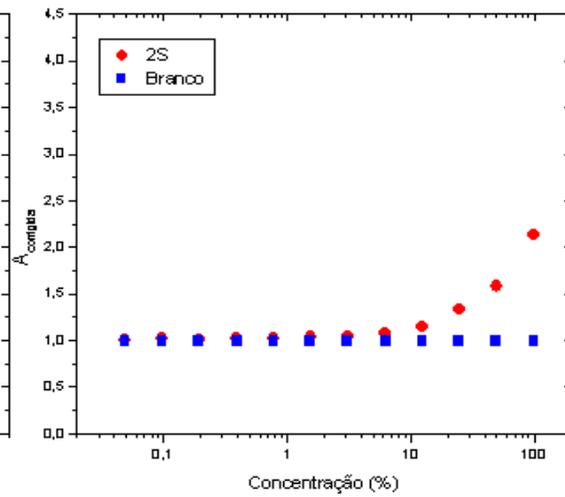
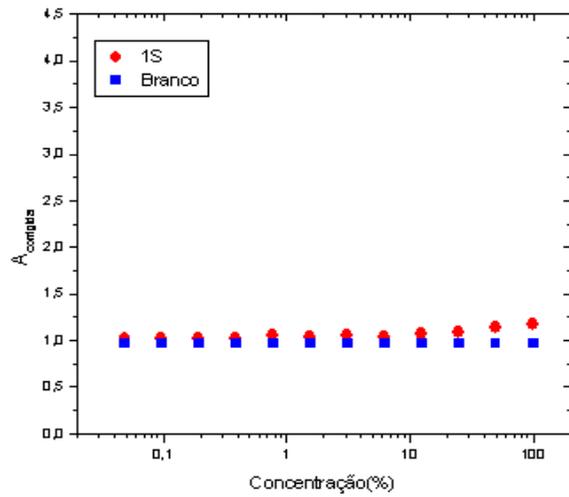
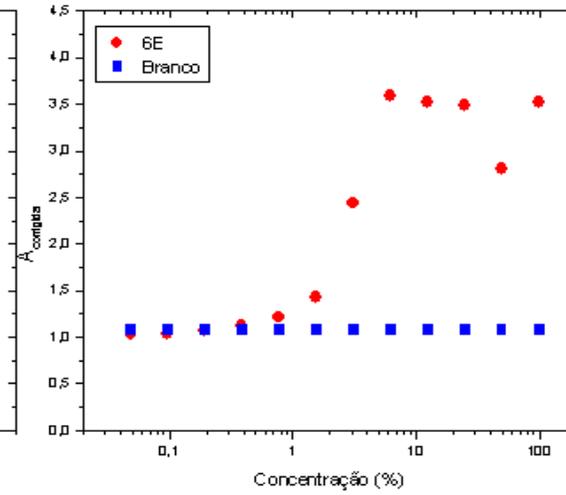
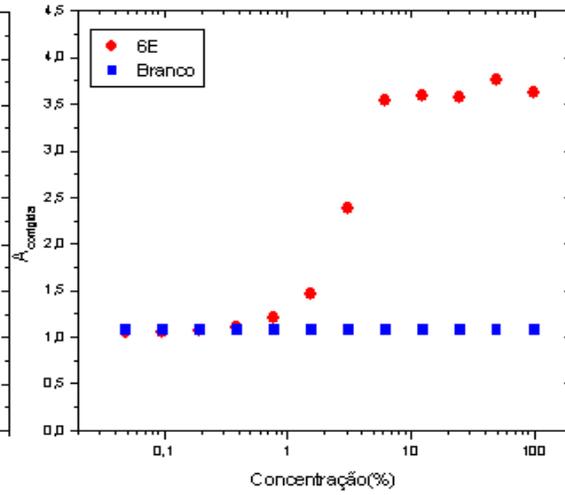
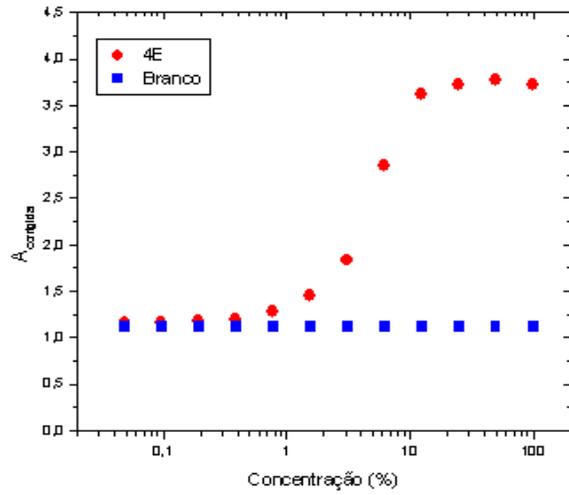
WATKINSON, A. J. et al. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, v. 41, p. 4164 – 4176, 2007.

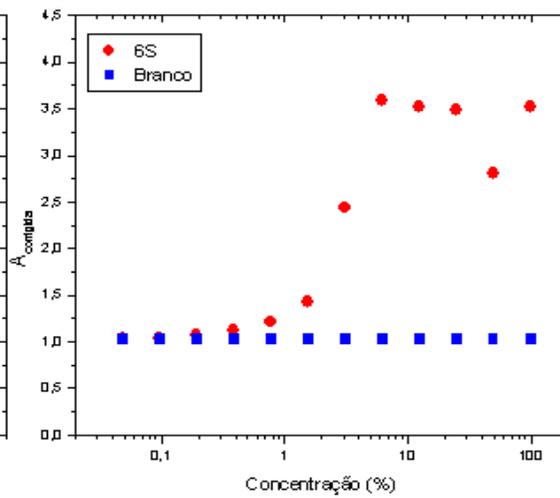
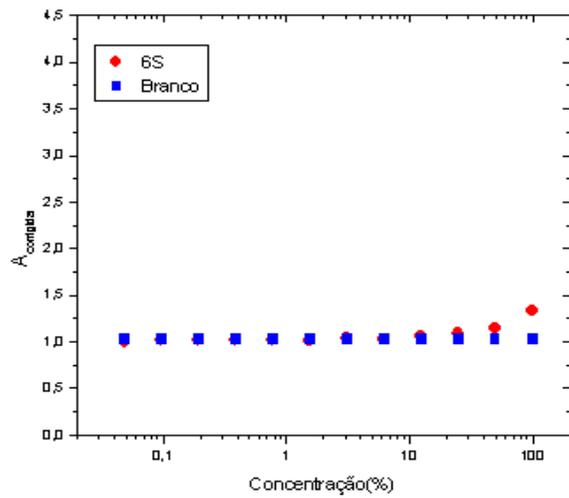
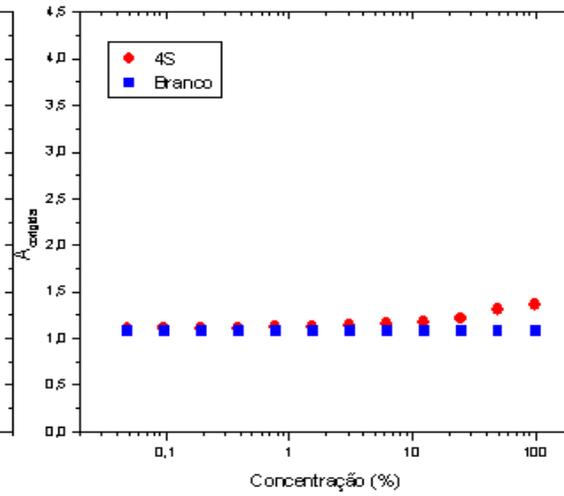
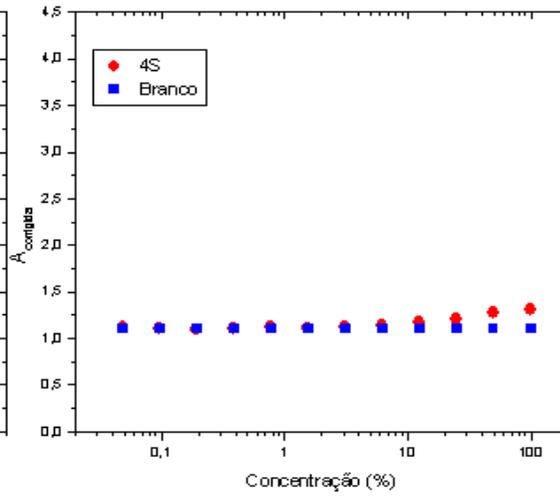
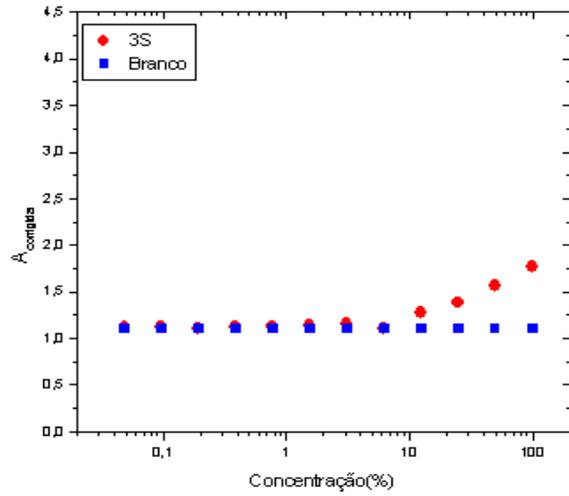
WESTER, P.W.; VAN DER VEN, L.T.M.; VOS. J.G.. Comparative toxicological pathology in mammals and fish: some examples with endocrine disruptors. *Toxicology* p. 27-32, 2004.

WEBER, L. P. et al. Increased kidney, liver, and testicular cell death after chronic exposure to 17 α - ethinylestradiol in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 33, p. 792-797, 2004.

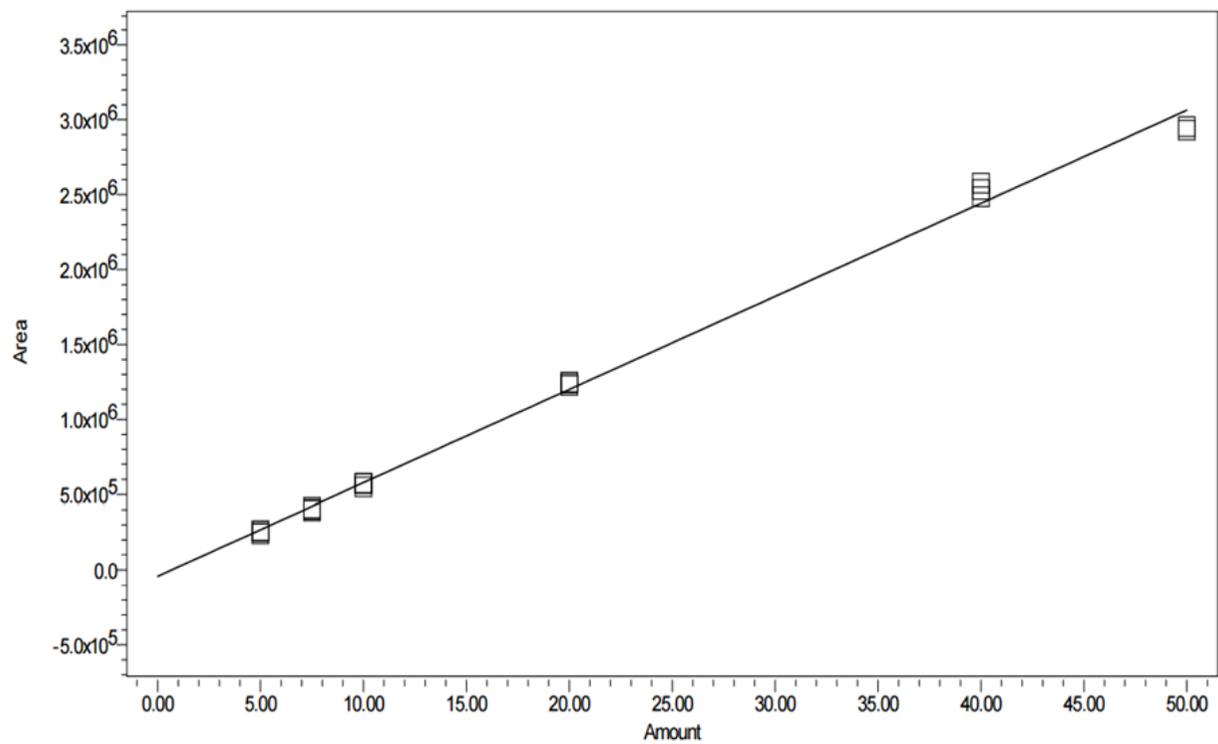
APÊNDICE 1: Curva dose-resposta das amostras de esgoto bruto e tratado



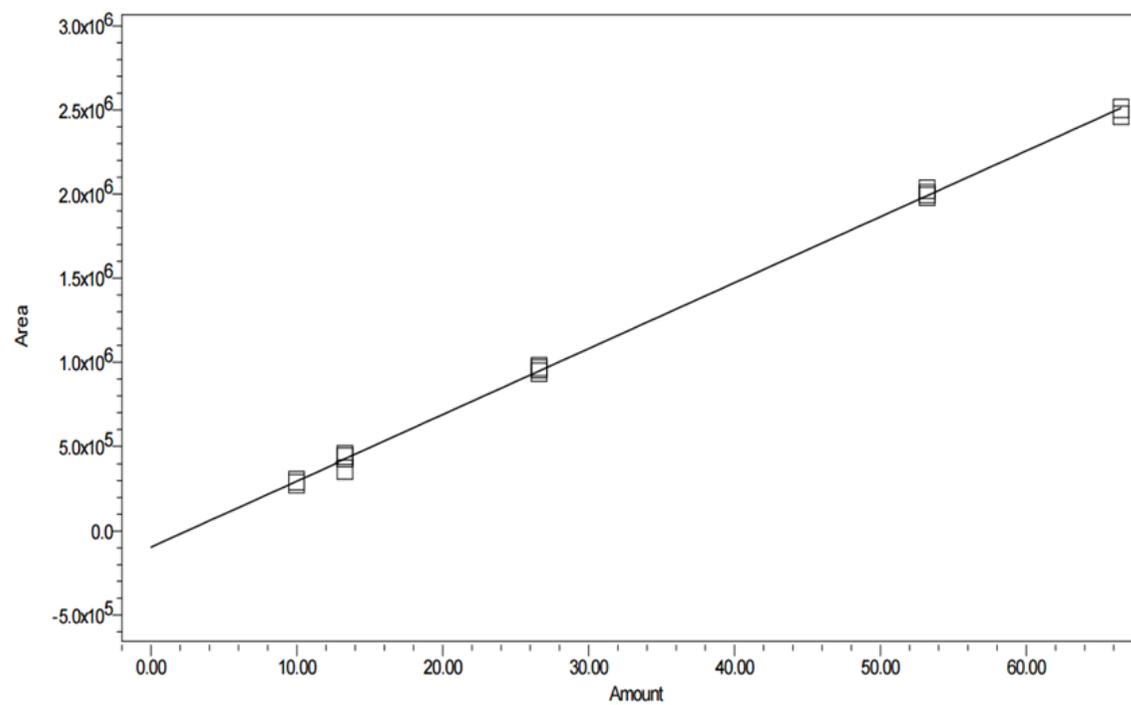




APÊNDICE 2: Curva analítica desenvolvida para a análise do E3



APÊNDICE 3: Curva analítica desenvolvida para a análise do EE2



APÊNDICE 4: Curva analítica desenvolvida para a análise do E2

