

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E
URBANISMO

**OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DE DISRUPTORES
ENDÓCRINOS EM ÁGUAS UTILIZADAS PARA
ABASTECIMENTO PÚBLICO DE CAMPINAS E
SUMARÉ - SÃO PAULO.**

Eleonilce Rosa Rossi Gerolin

Campinas, SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA
BAE - UNICAMP

G319o Gerolin, Eleonilce Rosa Rossi
Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em
águas utilizadas para abastecimento público de
Campinas e Sumaré - SP / Eleonilce Rosa Rossi
Gerolin.--Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Ricardo de Lima Isaac
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura
e Urbanismo.

1. Estrógenos. 2. Água – Estação de tratamento.
3. Água - Consumo. I. Isaac, Ricardo de Lima. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. III. Título.

Título em Inglês:. Occurrence and removal of endocrine disruptor compounds
in drinking water at Campinas and Sumaré, Sao Paulo State, Brazil.

Palavras-chave em Inglês: Estrogens, water treatment plant, drinking water.

Área de concentração: Saneamento e Ambiente

Titulação: Doutor em Engenharia Civil

Banca examinadora: Regina Maura Bueno Franco, Dione Mari Morita, José
Euclides Stipp Paterniani e Ruben Bresaola Junior

Data da defesa: 27/2/2008.

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Civil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E
URBANISMO**

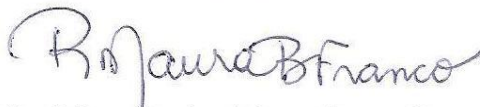
**OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DE DISRUPTORES
ENDÓCRINOS EM ÁGUAS UTILIZADAS PARA
ABASTECIMENTO PÚBLICO DE CAMPINAS E
SUMARÉ S.P.**

Eleonilce Rosa Rossi Gerolin
(eleonilce@yahoo.com.br)

Tese de Doutorado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:



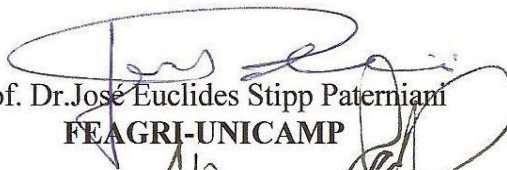
Prof. Dr. Ricardo de Lima Isaac
Presidente e Orientador-FEC-UNICAMP



Prof. Dra. Regina Maura Bueno Franco
IB-UNICAMP



Prof. Dra. Dione Mari Morita
POLI-UP



Prof. Dr. José Euclides Stipp Paterniani
FEAGRI-UNICAMP



Prof. Dr. Ruben Bressola Junior
FEC-UNICAMP

Campinas, 27 de fevereiro de 2008

“O Deus que fez o mundo e tudo que nele há, sendo
Senhor da Terra, não habita em templos feito por mãos
de homens; nem tão pouco é servido por mão de
homens, como que necessitando de alguma coisa; Pois
Ele mesmo é quem dá a todos a vida, a respiração, e
todas as coisas” Atos 17: 24 e 25.

Ao meu Deus:

Porque Nele vivemos, nos movemos e existimos.

(Atos 17:28)

Aos meus mais preciosos bens:

Meu esposo Marco Antonio Gerolin

e a minha filha Anna Gabrielle Rossi Gerolin.

Ao professor Ricardo Isaac, pela orientação e amizade.

Ao professor Marcos Eberlin, do Laboratório Thompson do Instituto de Química da UNICAMP, por cujo intermédio foi possível realizar as análises por CLAE-MS/MS.

À professora Carla Beatriz G. Bottoli, do Instituto de Química da UNICAMP, que tão prontamente me auxiliou, motivou e cedeu o Laboratório de Química Analítica para realizar parte deste trabalho.

À professora Regina Maura Bueno Franco, do IB-UNICAMP por emprestar sua única bomba de vácuo em um momento crucial deste trabalho.

À professora Dione Mari Morita POLI-USP pelo incentivo e apoio.

Ao Professor. José Roberto Guimarães (Tuca), por trazer em uma de suas aulas o tema hormônios na água, despertando assim o meu interesse por esse assunto.

À FEC, por proporcionar-me a oportunidade de desenvolver novos conhecimentos.

Aos funcionários da Secretaria e pós graduação e extensão da FEC.

Ao Centro Universitário Adventista de Engenheiro Coelho, por ceder o Laboratório de Química da Faculdade de Engenharia Civil e equipamentos para parte desse trabalho.

Ao Hélio Martins Junior, pelo suporte com as análises no CLAE-MS/MS.

À Applied-Biosystem, por prover o equipamento para análises.

Aos funcionários dos laboratórios Thompson e de Analítica do IQ-UNICAMP.

Ao IPEN, por ceder espaço no Laboratório de Pesquisa Ambiental.

À SANASA-Campinas e DAE-Sumaré, que apoiaram a realização deste trabalho bem como a seus funcionários, que prontamente auxiliaram nas coletas de amostras de água.

Ao Humberto e ao Ricci, pelo apoio e incentivo.

À Livia Agujaro, querida colega do grupo de pesquisa, por seu otimismo e amizade.

Ao professor Naor, coordenador da Faculdade de Engenharia Civil-UNASP, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Professor Rui, que tão bondosamente me apoiou no decorrer desse trabalho.

À Ana Peres, que prontamente me atendeu e ajudou quando precisei.

Ao meu esposo, por sua cumplicidade, incentivo e companheirismo e a minha filhinha por ter que dividir a mamãe com o laboratório e o computador por longos períodos.

Aos meus alunos do UNASP, que compreenderam meus momentos de cansaço e estresse.

A minha mãezinha, que me ensinou a perseverar, mas não viu o fim deste estudo

A “mãe Nair”, minha sogra, que muito me ajudou e não pode ver o término deste trabalho.

A todos os meus parentes e amigos que com apoio e carinho contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

À Natiara, pela força em momentos difíceis e auxílio em minhas atividades domésticas no período final deste trabalho.

E, acima de tudo e de todos, ao meu Deus, meu Salvador, meu Amigo, meu Guia, sempre presente dando-me saúde, coragem e capacidade, paz e confiança em todos os momentos.

Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré-SP.

Autora: MSc. Eleonilce Rosa Rossi Gerolin.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Isaac.

Palavras-chave: Disruptores endócrinos, estrógenos, micropoluentes, estrogenicidade, estação de tratamento de água, água para consumo humano.

A ocorrência de compostos considerados disruptores endócrinos (DE) em efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) e em águas superficiais em concentrações de risco para animais silvestres constitui campo de pesquisa de elevado interesse devido à probabilidade de que esses micropoluentes não sejam removidos nos processos físico-químicos empregados em Estação de Tratamento de Água (ETA) convencional. O presente trabalho avaliou a ocorrência de estrógenos naturais estrona (E1), 17 β Estradiol (E2), Estriol (E3), o estrógeno sintético 17 α Etinilestradiol (EE2) e Nonilfenol (NP) em água de abastecimento público das cidades de Campinas e Sumaré-SP. Para tal, coletou-se água bruta (do rio Atibaia, na entrada da estação) e água tratada nas ETAs 3 e 4 de Campinas e ETA 2 de Sumaré, num período de três semanas. Os procedimentos analíticos empregados foram extração em fase sólida e análise por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa (CLAE-EM/EM). A média dos resultados obtidos para água tratada de Campinas e Sumaré foram, respectivamente, de 0,10 e 0,08 ng/L de E1, 0,92 e 1,30 ng/L de E2, 0,70 e 0,62 ng/L de E3, 275 e 472 ng/L de EE2 e 6,14 e 4 ng/L de NP. O tratamento utilizado em Campinas remove, em média, acima de 80% dos DE em estudo, com exceção de EE2, cuja remoção foi de 38%. Em Sumaré, a remoção foi da ordem de 80% de E1 e E2, 64% de E3 ; 55% NP e 41% de EE2. Considera-se que a oxidação por cloro tenha sido preponderante na remoção dos DE alertando-se, porém, para a probabilidade da formação de subprodutos potencialmente estrogênicos. Mesmo ante tal eficiência de remoção, a presença de DE, detectados em água tratada, ainda que em pequenas concentrações, pode atribuir atividade estrogênica, haja vista que estrógenos naturais e sintéticos no ambiente podem exercer efeitos mesmo em concentrações muito baixas (1ng/L) .

Occurrence and removal of endocrine disruptor compounds in drinking water at Campinas and Sumaré, São Paulo State, Brazil.

Author: MSc. Eleonilce Rosa Rossi Gerolin

Supervisor: Dr. Ricardo de Lima Isaac

Key words: endocrine disruptor compounds, estrogens, micro pollutants, water treatment plant, drinking water.

The occurrence of potential endocrine disruptor compounds (EDC) in wastewater treatment plant (WWTP) effluent and surface waters at high concentrations harmful for aquatic life has been an interesting research field due to the probability of these micro pollutants to break through water treatment plant (WTP). The present paper evaluated the occurrence of natural estrogens such as estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), as well as the synthetic estrogen 17 α ethinylestradiol (EE2) and nonylphenol (NP) at water supply systems of Campinas and Sumaré. Raw water from Atibaia River and treated water samples were collected from Campinas WTP-3-and-4 and Sumaré WTP-2 over a three-week period. The analytic technique used was solid phase extraction and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The average results obtained for drinking water in Campinas and Sumaré were, respectively, 0.03 and 0.06ng/L for E1, 0.93 and 1.32ng/L for E2, 0.70 and 0.72ng/L for E3, 91.2 and 154ng/L for EE2 and 6.14 and 4ng/L for NP. Campinas WTP obtained an average removal of $\geq 80\%$ of focused EDC, except for EE2, whose efficiency was 38%; Sumaré WTP removal efficiency was 80% for E1 and E2, 60% for E3 and NP and 41% for EE2. Chlorine oxidation was probably the major treatment step for EDC removal, though potentially estrogenic by-products could have been formed as well. The presence of EDC in drinking water, despite the low concentrations, could provide estrogenic activity, since it is well known that natural and synthetic estrogen in the environment can produce effects at very low concentration (1ng/L).

LISTA DE FIGURAS**páginas**

Figura 1: Glândulas, órgãos e tecidos que enviam e recebem hormonais no corpo	13
Figura 2: Fluxograma do sistema reprodutor endócrino. (BROOKS, 1998)	14
Figura 3: Efeitos dos Disruptores Endócrinos sob os receptores (COLBORN 1997)	16
Figura 4: Crescimento anual do termo disruptores endócrinos	24
Figura 5: Diagrama dos processos utilizados na ETA	52
Figura 6: Cartucho típico empregado em extração em fase sólida	57
Figura 7: Formato de cartuchos empregado em EFS	57
Figura 8: Esquema das etapas do procedimento da extração em fase sólida estudada	59
Figura 9: Diagrama do princípio de operação de um espectrômetro de massa	61
Figura 10: Esquema do sistema e espectrometria de massa triploquadupolo API 5000	65
Figura 11: Estruturas dos DE estudados neste trabalho	70
Figura 12: Mapa do sistema de produção e distribuição de água de Campinas	74
Figura 13: Fotografia aérea da ETA 3 e 4	75
Figura 14: Fotografia aérea ponto de captação ETA 3 e 4	75
Figura 15: Diagrama do processo de tratamento da ETA 3 e 4 – SANASA	77
Figura 16: Diagrama do processo de tratamento da ETA II de Sumaré – DAE	78
Figura 17: Equipamento de espectrometria de massa acoplado a CLAE	81
Figura 18: Esquema do sistema de espectrometria de massas triploquadupolo	83
Figura 19: Fluxograma para EFS empregando cartuchos C 18	85
Figura 20: Sistema de EFS da amostra <i>in natura</i> - ETA Campinas e Sumaré	88
Figura 21: EFS das amostras tratadas ETA Sumaré e ETA Campinas	89
Figura 22: Sistema de eluição dos analitos percolados no cartucho	90
Figura 23: Espectro de massa EM/EM do Estrona (E1)	94
Figura 24: Espectro de massa EM/EM do Estradiol (E2)	94
Figura 25: Espectro de massa EM/EM do Estriol (E3)	95
Figura 26: Espectro de massa EM/EM do Etinilestradiol (EE2)	95
Figura 27: Espectro de massa EM/EM do Nonilfenol (NP)	96
Figura 28: Cromatograma do composto Nonilfenol	97
Figura 29: Cromatograma do composto Estrona	97

Figura 30: Cromatograma do composto Estradiol	98
Figura 31: Cromatograma do composto Estriol	98
Figura 32: Cromatograma do composto Estinilestradiol	99
Figura 33: Cromatograma do branco utilizado para as fortificações	99
Figura 34: Curvas analíticas típicas de calibração dos DE estudados	102
Figura 35: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de nonilfenol (coleta em 14/08/07).	103
Figura 36: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de 17β Estradiol (coleta em 14/08/07).	104
Figura 37: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de 17α Etinilestradiol (coleta em 14/08/07).	105
Figura 38: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de Estrona (coleta em 14/08/07).	106
Figura 39: Cromatogramas do Padrão e das amostras de água bruta de Campinas, com a presença de Estriol (coleta 14/08/07).	107
Figura 40: Cromatogramas das amostras de água tratada de Campinas	108
Figura 41: Cromatogramas das amostras da água bruta da ETA de Sumaré - coleta 14/08/02	109
Figura 42: Cromatogramas das amostras da água tratada da ETA de Sumaré-coleta 14/08/07	110

LISTA DE TABELAS**páginas**

Tabela 1: Concentrações das substâncias estrogênicas identificadas em águas de efluentes de ETEs rios e água de ETAs.....	25
Tabela 2: Excreção diária ($\mu\text{g/L}$) per capita de estrógeno por humano.....	26
Tabela 3: Compostos e Classe de compostos conhecidos de serem DE	31
Tabela 4: Relação da concentração de DE em efluente de ETE com impacto potencial à animais selvagens	40
Tabela 5: Seminários, comitês e relatórios de avaliação sobre os DE no ambiente.....	45
Tabela 6: Monitoramento de estrógenos na ETE da Penha-RJ	46
Tabela 7: Remoção de DE de Planta Piloto de ETE por digestão aeróbica e anaeróbica	47
Tabela 8: Comparação de remoção de NP e BPA em planta piloto de ETA	53
Tabela 9: Relação de metodologias analíticas para identificar e quantificar estrógenos. naturais e sintéticos.....	55
Tabela 10: Propriedades físicoquímicas dos DE avaliados.....	69
Tabela 11: Parâmetros otimizados para analitos no modo MRM	83
Tabela 12: Gradiente de eluição ⁷	84
Tabela 13: Data, hora e clima das coletas realizadas	87
Tabela 14: Recuperação dos analitos na fortificação 2ng/L e 0,5 ng/L	100
Tabela 15: Recuperação dos analitos na fortificação 10ng/L.....	100
Tabela 16: Recuperação dos analitos após otimização da metodologia	101
Tabela 17: Limite de quantificação e detecção.....	101
Tabela 18: Concentrações (ng L^{-1}) dos DE obtidas para águas das ETAs estudadas	112
Tabela 19: Concentrações (ng/l) dos DE nas duplicatas.....	113
Tabela 20: Condições de operação das ETA estudadas no período das coletas	115
Tabela 21: Alguns parâmetros da água bruta coletada	116
Tabela 22: Resultado das concentrações e remoções dos DE estudados.....	117
Tabela 23: Média das concentrações e remoções dos DE da água.....	118
Tabela 24: Estimativa da atividade estrogênica da água tratada nas ETA estudadas.....	119

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVEATURAS

- **APCI:** Atmospheric Pressure Chemistry Ionization
- **APEO:** Alquilfenol polietoxilato.
- **Al₂(SO₄)₃:** Sulfato de alumínio
- **BBP:** Butilbenzilftalatos.
- **BiO₃:** Óxido de bismuto
- **BPA:** Difenol A.
- **CaOH:** Hidróxido de Cálcio
- **C18:** Sorvente contendo o Grupo Octadecil
- **CAG:** Carvão Ativado Granular.
- **CdS:** Sulfeto de cádmio.
- **CG:** Cromatografia gasosa.
- **CI:** Ionização química.
- **CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- **CSTE:** Comitê de Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente.
- **DBP:** Dibutilftalatos .
- **DBP:** Dibutilftalatos
- **DDD:** 1,1-Dicloro-2,2 – di(p-clorofenil) etano
- **DDE:** 1,1-Dicloro-2,2 – di(p-clorofenil) etileno
- **DDT:** 1,1,1-Tricloro-2,2 – di(p-clorofenil) etano
- **DEs :** Disruptores endócrinos.
- **DEHP:** Di(2etilhexil)ftalato.
- **DES:** Dimetilestilbesol.(anticoncepcional).
- **E1 :** Estrona.
- **E2 :** 17 β Estradiol.
- **E3 :** Estriol.
- **EE2:** 17α etinilestradiol.
- **EFS:** Extração em Fase Sólida.
- **EI:** Impacto de elétrons.

- **ELISA:** Enzyme-Liked Immunosorbent Assay.
- **ENV:** Resina de copolímero poliestireno.
- **ES:** Electrospray.
- **ETA:** Estação de tratamento de água potável.
- **ETE :** Estação de tratamento de esgoto.
- **EU:** União Européia.
- **EUA:** Estados Unidos da América.
- **FAB:** Fast-Atom Bombardement.
- **Fe₂O₃:** Óxido de ferro III.
- **FSH:** Hormônio estimulador de folículos.
- **GnRH:** Secreção hormonal gonadotrófica.
- **HPAs:** Hidrocarbonetos poli-aromáticos.
- **HPLC:** High-performane liquid chromatography.
- **H₂ SiF₆ :** Ácido fluorsilícico.
- **IEH:** Institute for Environment and Health.
- **IPCS:** International Program Chemistry Security (Programa Internacional de Segurança)
- **IPEN:** Instituto de Peaquisas Energéticas e Nucleares.
- **IS :** Ionspray.
- **LD:** Limite de detecção.
- **LH :** Hormônio luteinizante.
- **LOQ:** Limite de quantificação
- **MALDI:** Matrix-Assisted Laser Dessorption.
- **MRM:** Monitoramento de Reações Múltiplas.
- **MS:** Espectrometria de Massa.
- **N₂:** Nitrogênio.
- **NF:** Nanofiltração.
- **NP :** Nonilfenol.
- **OCDE:** European Organization for Economic Co-operation and Development.
- **OMS:** Organização Mundial de Saúde.
- **OR:** Osmose de fase reversa.

- **PAC:** Carvão Ativado em Pó.
- **PCB:** Bifenilas poli-cloradas.
- **POA:** Processos oxidativos avançados.
- **PPCPs:** Personal care product.
- **PVC :** Cloreto de Polivinila.
- **R :** Recuperação.
- **RIA:** Radioimmunoassay.
- **SPE:** Solide phase extraction.
- **TBT:** Tributilestanho.
- **TPT:** Trifenilestanho.
- **TiO₂:** Óxido de titânio.
- **US EPA:** Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos.
- **USP:** Universidade Estadual S.P.
- **UV:** Radiação Ultravioleta.
- **VTG:** Vitelogenina , proteína precursora da gema de peixes fêmeas.
- **ZnO:** Óxido de zinco.
- **ZnS:** Sufeto de zinco.
- **WHO:** Organização mundial de saúde.
- **WO₃ :** Óxido de tungtênio.

SUMÁRIO

LISTA .DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	xvii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	07
CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. Visão Geral do Sistema Endócrino Reprodutivo.....	13
3.2. Efeitos dos Desruptores Endócrinos Sobre os Receptores	15
3.3. Visão Histórica dos Disruptores Endócrinos.....	17
3.4. Estudos de remoção de Disruptores Endócrinos em ETE.....	46
3.5. Processo de tratamento de água em ETA	49
3.5.1. Carvão ativado.....	49
3.5.2. Membranas filtrantes	49
3.5.3. Processos oxidativos avançados	50
3.6. Remoção de disruptores endócrinos em ETA	50
3.7. Identificação e quantificação de DEs em amostras aquosas.....	54
3.7.1. Extração em Fase Sólida	56
3.7.1.1. Modo de Operação da Extração em Fase Sólida	59
3.7.2. Cromatografia Liquida de Alta Eficiência Acoplada á EM	60
3.7.2.1. Espectrômetro de Massa (EM).....	58
3.7.2.2. Espectrometria de Massa em CLAE-EM/EM).....	61
3.7.3. Validação de Metodologia.....	66
3.8. Estrutura e Propriedades fisicoquímicas dos DE avaliados neste trabalho	68

CAPÍTULO 4- MATERIAL E MÉTODO.....	71
4.1. Local de estudo.....	73
4.2. Descrição Geral da Bacia do rio Piracicaba	73
4.3. ETA 3 e 4 Campinas.....	74
4.4. ETA II Sumaré	77
4.5. Materiais	79
4.6. Estratégia experimental	80
4.6.1. Etapa 1: Estudos preliminares	80
4.6.2. Etapa 2: Otimização e validação do método cromatográfico	81
4.6.2.1. Condições de análise do sistema CLAE/EM/EM7.....	82
4.6.3. Etapa 3: Otimização e validação do método da Extração em fase	84
4.6.4. Procedimento e preparo das amostras para recuperações.....	86
4.6.5. Etapa 4: Identificação e quantificação dos analitos.....	87
 CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 91
5.1. Validação da metodologia CLAE/EM/EM	93
5.2. Determinação de DE nas águas bruta e tratada das ETAs de Campinas e Sumaré.....	103
5.3. Avaliação da remoção dos DEs nas ETAs de Campinas e Sumaré.....	115
 CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÃO.....	 123
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 129
 ANEXOS	 155

**“Escute-me; Eu sou sempre o mesmo.
Eu sou o primeiro e Eu sou o último
e a minha própria mão lançou os
alicerces da terra e minha mão
direita estendeu os céus.”
Isaías 38:13**

1- INTRODUÇÃO

O emergente interesse da comunidade científica pelo estudo dos contaminantes ambientais com atividades hormonais, em décadas recentes, atribui-se às evidências de que estes podem estar causando efeitos adversos à saúde dos animais silvestres e do homem. COLBORN *et al* (1997) no livro “Our Stolen Future”, oferece uma descrição ampla de pesquisas realizadas sobre os agentes químicos que alteram as mensagens hormonais . Em julho de 1991 um grupo de cientistas multidisciplinar de vários países se reuniu pela primeira vez para discutir suas preocupações em relação à disseminação e efeitos dos agentes químicos que alteram o sistema endócrino presente no ambiente e declararam que:

*“Um grande número de agentes sintéticos que foram lançados no ambiente, assim como alguns agentes naturais, podem alterar o sistema endócrino dos animais, inclusive do homem. Muitas populações de animais já foram atingidas por tais compostos. Os impactos observados incluem: disfunções da tireóide em aves e peixes; diminuição da fertilidade entre aves, peixes, moluscos e mamíferos; queda da produção de filhotes entre aves, peixes e tartarugas; deformações congênitas grosseiras em aves, peixes e mamíferos; anomalias comportamentais entre pássaros; desmasculinização e feminização entre aves, peixes, mamíferos; e o comprometimento do sistema imunológico de pássaros e mamíferos. Os seres humanos também foram atingidos por compostos dessa natureza. O DES (dietilestilbestrol), um agente químico terapêutico sintético, tem efeitos estrogênicos: fetos quando expostos ao DES no útero sofrem anomalias congênitas no sistema reprodutivo e apresentam redução da fertilidade. Os efeitos observados em fetos expostos ao DES em útero são comparáveis àqueles observados em animais silvestres contaminados, ou em animais de laboratório, sugerindo que seres humanos podem estar correndo os mesmos riscos ambientais que afetam os animais silvestres” (COLBORN *et al.*, p282,1997).*

A literatura chama esses agentes químicos estrogênicos de *endocrine disrupters*. Segundo o dicionário KingHost (2007) o termo *disrupção* em português é o mesmo que *ruptura*; logo, *disruptor endócrino* é o causador da ruptura, ou seja, o que rompe o delicado equilíbrio do sistema endócrino, perturbando-o. Portanto, neste trabalho será utilizado o termo *Disruptor Endócrino (DE)* para os agentes químicos que perturbam o sistema endócrino. O termo pode ser traduzido ainda por *interferentes endócrinos*, *perturbadores* ou *moduladores endócrinos*.

Os DEs podem ser classificados em quatro tipos: os que ocorrem naturalmente no organismo (por ex. *estriol*, *estrona*, *estradiol*); os que são sintetizados para serem ingeridos como medicamento (por ex. *17 α* *etinilestradiol*, *diazepan*, etc); os “*xenoestrogênios*” ou externos, gerados pelas modernas indústrias químicas e presentes em produtos de uso doméstico (por ex.. *nonilfenol*, *tributilestanho*, etc.) e os *fitoestrogênios* (*genesteína*, *daidzeína*, etc.) presentes em plantas alimentícias, muitos dos quais promovem importantes benefícios à saúde.

Os efeitos dos DEs sobre a saúde dos animais e do homem têm chamado a atenção de cientistas e órgãos governamentais de todo mundo. Alguns órgãos públicos vêem os DE na água como um risco potencial para a saúde humana e têm estimulado e priorizado pesquisas na área de saúde humana (SADIK *et al* 1999). Este problema de saúde pública e ambiental tem sido motivo de muitos encontros e congressos científicos (VANDELAC, *et al.* 200.,, SKAKKEBAEK *et al*, 2001, SNYDER *et al.* 2002, KNACKER *et al* 2002, SNYDER *et al.* 2002, KNACKER *et al* 2002, VAN WYK *et al.* 2002, KOBUEKE *et al.* 2002, FURHACKER *et al.* 2002) .

Muitos estudos em vários países documentam os efeitos adversos à saúde reprodutiva de animais silvestres, principalmente peixes (ROUTLEDGE *et al*, 1998, PURDOM *et al.* 1994, TYLER *et al.* 1998, OAKES *et al.* 2005, SEKI *et al*, 2005). A grande preocupação é que alguns desses DEs podem ser biologicamente ativos em concentrações extremamente baixas, tais como os *estrógenos* naturais e sintéticos, em nível de ng/L e os compostos *alquilfenólicos* (*nonilfenol*) que são estrogênicos em até 1 μ g/L (ROUTLEDGE *et al.* 1998, BECK *et al.*, 2005). Evidências crescentes mostram que os DEs não obedecem o princípio

clássico de toxicologia dose-resposta, em contraste, produzem respostas significativas em doses extremamente baixas (SADIK *et al.*, 1999).

A discussão sobre os efeitos na saúde humana é ainda controversa, devido à complexidade do sistema endócrino, pois muitos são os caminhos nos quais os DEs podem afetar a saúde. Entretanto, a comunidade científica mundial vem alertando sobre o perigo da exposição a esses contaminantes ambientais com atividade hormonal. A União Européia lançou o projeto de pesquisa COMPREENDO (Comparative Research on Endocrine Disrupter) com o objetivo de melhorar a compreensão dos efeitos dos DEs nos animais silvestres aquáticos e nos seres humanos e de melhorar o padrão de qualidade ambiental e saúde pública da Europa (GOETHE *et al.* 2006). Mesmo que o risco para a saúde humana associado à exposição aos estrógenos ambientais não seja claramente definido, o potencial de risco para peixes e animais silvestres é um indicativo de que é necessário um melhor entendimento das fontes e destino dos DEs no ambiente aquático.

A ocorrência dos DEs em efluente de estações de tratamento de esgoto (ETE), água de rios receptores de esgoto bruto ou tratado e águas tratadas para abastecimento público tem sido estudada em todo do mundo (KIM *et al.*, 2007, CHOI *et al.*, 2006, BRAGA *et al.* 2005, ESPERANZA *et al.*, 2004, ROSENFELDT *et al.*, 2004, NGHIEM *et al.*, 2004, BARONTI 2001, JOHNSON *et al.*, 2000). Estes estudos têm mostrado que esses “hormônios ambientais” resistem ao tratamento primário de ETE e são lançados para os rios ou fontes de água, que são captadas, tratadas e reutilizadas para o abastecimento público. Investigações mostraram (GHISELL *et al.* 2006; KOLPIN *et al.* 2000; WESTERHOFF *et al.* 2005) que esses DE também não são removidos na ETA convencional e estão presentes na água potável, podendo comprometer a saúde humana.

No Brasil, a maioria do esgoto doméstico não é tratado, o que torna os mananciais mais poluídos. O crescimento exponencial da população humana tem aumentado a demanda do limitado suplemento de água da Terra, e o reuso é necessário. A maioria das ETAs não possui um avançado processo de tratamento. Portanto, monitorar e preservar a qualidade da água é uma necessidade essencial do século XXI.

O reuso não planejado de esgotos para fins potáveis, ainda que involuntário, é fato em regiões metropolitanas. O rio Atibaia, formador do rio Piracicaba é, receptor dos esgotos da

Região de Campinas, a maioria não tratada. A ocorrência de DE nesses mananciais é fato (GHISELLI 1996). No Brasil, uma grande parte dos disruptores endócrinos ainda não faz parte dos padrões de potabilidade que são definidos pela Portaria 518 GM do Ministério da Saúde, de 25 de Março de 2004 e, conseqüentemente, não são analisados nas estações de tratamento. O estudo da qualidade da água é fundamental para manter a saúde e boa qualidade de vida do homem. Por esta razão, investigar a presença e a eficiência de remoção dessas substâncias nas ETAs é uma necessidade urgente.

Segundo relatório de qualidade de águas da CETESB (2006) apenas 27% e 4% do esgoto coletado da região Campinas e Sumaré é tratado. Os dados mostram que os municípios de Campinas e Sumaré apresentam elevadas cargas poluidoras, com sério comprometimento dos ribeirões Quilombo, Samambaia e Anhumas. Dos 18 municípios da Região Metropolitana de Campinas, 7 não apresentam qualquer tipo de tratamento de esgoto como, por exemplo, Paulínia. A água captada no rio Atibaia para as ETAs de Campinas e Sumaré sofre impacto significativo do lançamento de esgoto *in natura* ou parcialmente tratado de municípios localizados a montante, tais como Vinhedo, Valinhos e Campinas. Diversos compostos orgânicos presentes nos corpos d'água, embora não contemplados na legislação ambiental brasileira, também necessitam ser avaliados por poderem apresentar elevada toxicidade. Diante desse quadro, considera-se que há necessidade do monitoramento da qualidade da água potável dessas ETAs a fim de identificar e determinar as concentrações dos DE.

Este trabalho pretende contribuir para o conhecimento dos níveis de concentração desses micropoluentes emergentes, existentes nos mananciais e na água potável distribuída em Campinas-SP e Sumaré-SP. Além disso, deve dar indicações quanto à eficiência do tratamento nas ETA para remoção desses micropoluentes.

O trabalho também poderá ser usado para motivar novos estudos sobre a fonte e o destino destas e de outras tantas substâncias que podem ser endocrinamente ativas, bem como na avaliação de risco frente à exposição da população através do consumo da água potável. Adicionalmente, disponibilizar aos órgãos legisladores e de saúde pública, dados que possam ser utilizados futuramente para estudos sobre toxicidade e risco humano.

**“A terra seca-se e murcha,
o mundo definha...”**

Isaias 24:4

2. OBJETIVOS

. Este trabalho enfoca os hormônios naturais 17β estradiol (E2), estrona (E1), estriol (E3); o sintético 17α etinilestradiol (EE2); e o xenoestrogênio nonilfenol (NP) e tem por objetivos:

- Investigar a ocorrência dos disruptores endócrinos E2, E1, E3, EE2 e NP em mananciais no ponto de captações (*in natura*) e abastecimento público (água tratada) em estações de tratamento das ETAs 2 e 4 de Campinas-SP e ETA II de Sumaré-SP.
- Verificar a eficiência do tratamento para a remoção desses DE.

**“A terra está contaminada, pelos seus habitantes,
porque desobedecem as leis, violam os decretos e
quebram a aliança eterna”.**

Isaías 24:5

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 -VISÃO GERAL DO SISTEMA ENDÓCRINO REPRODUTIVO.

O sistema endócrino ou hormonal do homem é formado por um conjunto de glândulas posicionadas em todo corpo que inclui a hipófise pituitária, a tireóide, as paratireóides, as adrenais (ou supra-renais), as gônadas (testículos e ovários) e o pâncreas. Hormônios são substâncias químicas produzidas e excretadas pelas glândulas e liberados para a corrente sanguínea e os receptores nos vários órgãos e tecidos que reconhecem e respondem aos mesmos. Através dos hormônios, o sistema endócrino promove uma delicada integração entre diferentes tecidos do corpo humano; é responsável por regular o crescimento e o desenvolvimento, o metabolismo corporal, a reprodução, o sono, a sede, a fome e a imunidade. A figura 1 ilustra as glândulas que mais tradicionalmente estão relacionadas ao sistema endócrino no homem e na mulher (COLBORN *et al.* 1997).

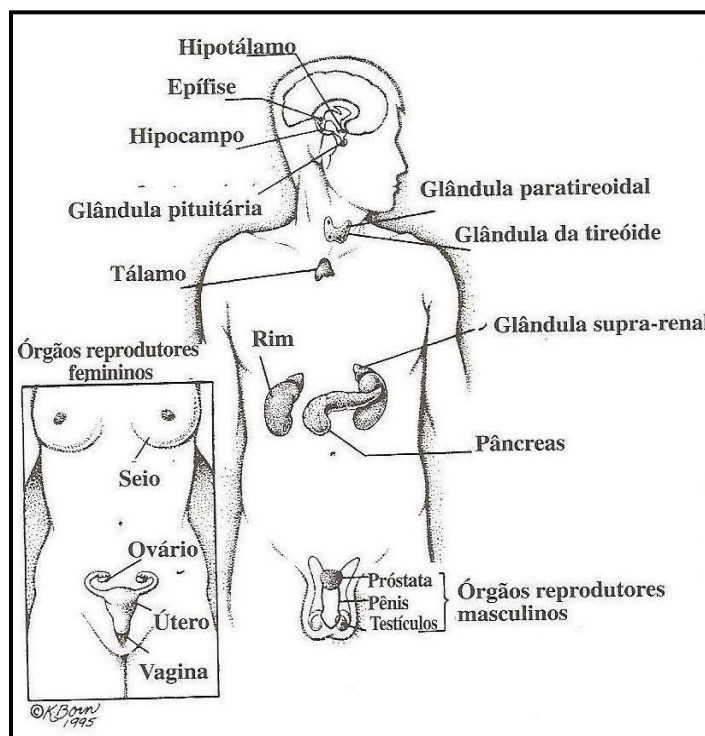


Figura 1: Algumas glândulas, órgão e tecidos que enviam e recebem mensagens hormonais no corpo (COLBORN *et al.*, 1997)

Os hormônios servem como mensageiros químicos que circulam no sangue, fazendo a ligação entre vários órgãos do sistema reprodutivo, coordenam o trabalho sincronizado dos órgão e tecidos para manter o funcionamento do corpo. O hipotálamo monitora constantemente os níveis de hormônios no sangue. Se os níveis de um determinado hormônio estiverem muito altos ou baixos, o hipotálamo manda uma mensagem à pituitária; esta indica para a glândula produtora desse hormônio se deve acelerar a produção, trabalhar mais devagar ou interromper as atividades. Assim, as mensagens vão e vêm continuamente. Sem esse constante *feedback*, o corpo humano seria uma multidão de, mais ou menos, 50 trilhões de células, ao invés de um organismo integrado, operando com um roteiro único. Qualquer interferência neste sistema extremamente balanceado pode levar a um desenvolvimento inapropriado do mesmo e alterações significativas dos vários processos que ali ocorrem (COLBORN et al. 1997).

Portanto, o controle hormonal reprodutivo começa no cérebro, por intermédio do hipotálamo (sistema nervoso central), que por meio da secreção hormonal gonadotrófica (GnRH) governa a atividade da hipófise pituitária, a qual serve como um amplificador do sinal cerebral dado pelos hormônios gonadotróficos, liberando o hormônio luteinizante (LH) e o estimulador de folículos (FSH), conforme esquematizado na figura 2.

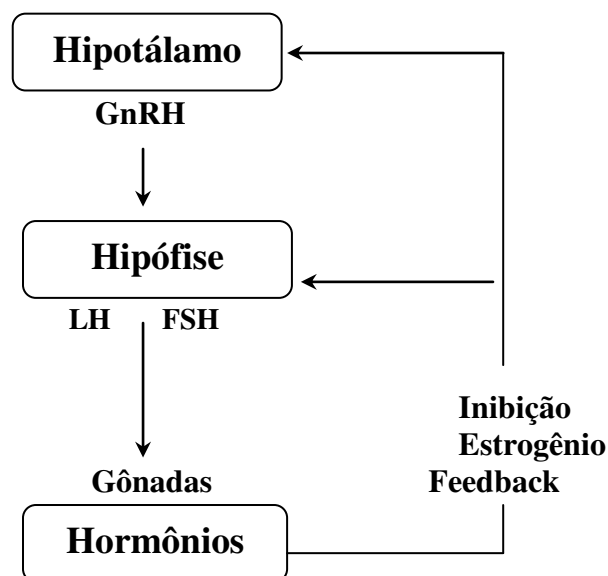


Figura 2. Fluxograma do sistema reprodutor endócrino. (BROOKS, 1998)

Estes hormônios agem sobre as gônadas de ambos os sexos (ovário e testículos) que produzem, respectivamente, os hormônios sexuais femininos e masculinos: estrógenos e andrógenos.

Andrógenos: são hormônios masculinos dos quais o mais importante é a testosterona. São essenciais para a espermatogênese normal (produção de espermatozóides), mas também mantêm a integridade normal dos órgãos sexuais tais como: próstata, vesícula seminal e epidídimo. Os androgênios também determinam o desenvolvimento físico e psíquico das características do homem.

Estrógenos: hormônios femininos que estimulam o desenvolvimento dos órgãos sexuais femininos, das mamas e de várias características sexuais secundárias. Os três principais hormônios sexuais presentes em quantidade significativa no plasma feminino humano, chamados estrogênios, são:

Estradiol: secretado pelo ovário, é o principal estrógeno;

Estrona: pequena quantidade, mais fraco que o estradiol;

Estriol: estrógeno fraco.

A potência estrogênica do estradiol é 12 vezes a do estrona e 80 vezes a do estriol (GUYTON *et al.* 1996). As concentrações de hormônios no sangue, necessárias para controlar a maioria das funções endócrinas, são extremamente pequenas, de até 1 pg mL (picograma por mililitro). O sistema endócrino pode ser afetado pelos interferentes de várias maneiras. Por exemplo, esses compostos podem ligar-se aos receptores hormonais e inibir ou imitar a sua ação natural ou afetar a síntese dos hormônios e seu metabolismo (PIVA *et al.* 1996, GORE *et al.* 2002) como detalhado no próximo tópico.

O corpo tem centenas de tipos diferentes de receptores feitos para um tipo específico de hormônio. O hipofisário tem vários tipos de receptores para monitorar os níveis de hormônios no sangue (COLBORN, 1997).

3.2 - EFEITOS DOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS SOBRE OS RECEPTORES

O receptor de estrógeno é uma proteína especial existente dentro das células em muitas partes do corpo, inclusive no útero, na mama, no cérebro e no fígado. As moléculas de

hormônio são minúsculas se comparadas aos amplos receptores, elas se encaixam como uma chave e a fechadura. Uma vez conectados se movem em direção ao núcleo da célula. Essa união entre hormônio e receptor tem em sua mira os genes que desencadeiam a produção de proteínas específicas (COLBORN *et al.*, 1997).

Um Disruptor Endócrino pode agir de várias maneiras em um receptor, provocando diferentes respostas, a figura 3 exemplifica estes efeitos em nível celular:

A- Célula em processo normal: um hormônio natural se liga a seu receptor e ativa os genes no núcleo da célula para produzir respostas biológicas apropriadas. No caso de estrógeno essa proteína acelera a divisão celular. Assim, para exemplificar, quando o estrógeno se uniu aos receptores no útero, fará com que o revestimento do útero se torne mais espesso.

B- Célula sob efeito de um mimetizador: disruptor endócrino é parecido com estrógenos e pode se ligar ao receptor hormonal, imitando (mimetizando) a ação de um hormônio natural e produzir uma resposta. Este processo é chamado de efeito agonista.

C- Célula sob o efeito de um bloqueador: os disruptores endócrinos podem também se ligar ao receptor bloqueando a ação hormonal; não desencadeiam uma resposta, mas impedem que os hormônios naturais se encaixem ao receptor. Este processo é denominado efeito antagonista.

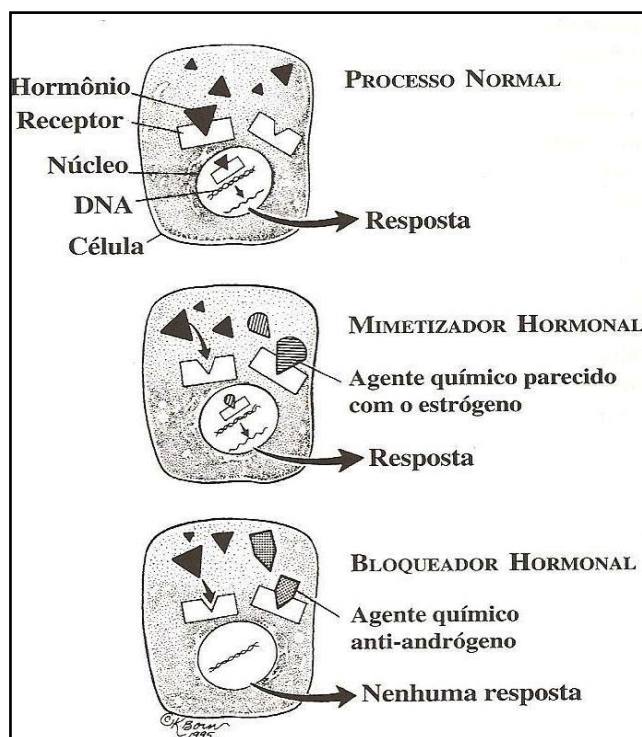


Figura 3: Efeitos dos disruptores endócrinos sob os receptores (COLBORN *et al* 1997)

Os mimetizadores ou bloqueadores hormonais alteram a atividade celular. O composto que estiver presente em maior número ou que vencer a competição para encontrar nos receptores, determina a resposta da célula, muda os sinais, mistura as mensagens causando toda classe de danos, dado que as mensagens hormonais organizam muitos aspectos decisivos do desenvolvimento hormonal, desde a diferenciação sexual até a organização do cérebro (SANTAMARTA *et al* 2001). Os disruptores endócrinos podem ainda afetar a síntese hormonal e o seu metabolismo.

Compostos que produzem efeito de feminização são conhecidos como estrôgenicos e compostos que produzem efeitos de masculinização são chamados de androgênicos. Um composto antiestrogênico inibe a ação biológica dos estrogênios inativando os receptores de estrogênios presentes nos tecidos alvo; e composto antiandrogênico inibe a ação biológica dos andrógenos presentes nos tecidos alvo.

Resumindo, os disruptores endócrinos são hormônios naturais, sintéticos ou outros compostos químicos que mimetizam, bloqueiam a ação dos hormônios ou afetam a síntese hormonal e seu metabolismo no corpo.

3.3 -VISÃO HISTÓRICA DOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS

O termo “disruptor endócrino” (*endocrine disrupter*: DE) foi utilizado pela primeira vez em julho de 1991, no encontro de pesquisadores no Centro de Conferência Wingspread, Racine, Wisconsin, nos Estados Unidos, realizado por Theo Colborn e colaboradores e a primeira publicação que mencionou este termo data de 1992 por COLBORN E CEMENT (MATTHIESSEN *et al* 2003). Embora os disruptores endócrinos sejam nomeados em campo de pesquisas recentes, seus efeitos na vida silvestre têm sido estudados há muito tempo. Já no início do século XX (1920), foi publicado que a condição sexual de ratas imaturas poderia ser induzidas injetando-se uma pequena quantidade do que era conhecido até então por hormônio folicular ovariano de porcos (MATTHIESSENE *et al.* 2003).

Em 1930 foi publicado que certos compostos podiam mimetizar hormônios endógenos de animais (WALKER *et al.* 1930). Em 1938, foi descoberto que compostos alquilfenólicos poderiam se ligar ao receptor hormonal e, conseqüentemente, causar efeitos endócrinos adversos (JOBILING, *et al.* 1998a). GREENE *et al.* (1939), da Faculdade de Medicina de Northwestern (EUA), demonstraram que doses extras de estrogênios naturais ou sintéticos, administrados a camundongos fêmeas no período neonatal, trouxeram sérias conseqüências aos filhotes intra-uterinos. Os filhotes fêmeos mostraram defeitos estruturais no útero, na vagina e nos ovários e os filhotes machos nasceram com genitálias deformadas.

Na década de 1940, foi observada uma epidemia de infertilidade em ovelhas da Austrália Ocidental. Pesquisadores descobriram que o “Fomonanetin”, substância química presente no trevo, uma planta que fazia parte das pastagens, era o responsável pelos problemas reprodutivos, pois mimetizavam os efeitos biológicos de estrogênio (BENNETTS *et al.*, 1946). Neste mesmo ano, foi publicado um artigo na revista *Science*, explicando a configuração molecular de compostos naturais e sintéticos que induziam bioatividades estrogênicas e androgênicas em ratos (SNYDER, 2002). Em 1948, foi mostrado que compostos androgênicos e estrogênicos interferem na metamorfose natural dos anfíbios (SLUCZEWSKI, *et al.* 1948).

BURLINGTON e LINDERMAN, em 1950, observaram que galos tratados com DDT (DE utilizado como inseticida) tinham testículos bem menores e não tinham cristas e barbelas como os galos normais. A literatura registra a esterilidade de 80% das águias americanas da Flórida neste período (COLBORN *et al.*, 1997). Na mesma década, foi observado que as lontras estavam desaparecendo dos rios e lagos da Inglaterra. Só na década de 1980, pesquisadores apontaram o Dieldrin e DDT (DE utilizado como inseticida organoclorado) como possível causador desse impacto (MASON *et al.*, 1986).

Nos anos de 1960 foi observada a morte e a infertilidade dos visons que se alimentavam de peixes nos Grandes Lagos no Estado de Michigan, Estados Unidos. Os criadores estavam cruzando visons domesticados, como sempre haviam feito, mas as fêmeas não estavam produzindo filhotes. Em 1967, a situação chegou a tal ponto que muitas fêmeas

ficaram estéreis e os poucos filhotes que nasciam, morriam em pouco tempo. Na busca de uma causa, pesquisadores da universidade estadual de Michigan identificaram a presença de PCB, um agente químico clorado, como o provável causador do fenômeno observado (minitizador de estrógeno).

Foi ainda nesta década, que Rachel Carson em seu livro “Silent Spring” (Primavera Silenciosa) fez uma advertência eloqüente sobre os perigos representados por substâncias e químicas que alteram as mensagens hormonais, que estavam contaminando a natureza e poderiam causar danos à saúde dos seres humanos e ao ecossistema. O livro, agora clássico, contribuiu para dar início ao movimento ambientalista.

O primeiro artigo publicado sobre hormônio humano em água foi em 1965, por Tumm-Zollinger e Fair, mostrando que os esteróides não foram completamente eliminados durante o processo de tratamento de esgoto.

Na década de 1970, foi observado que vários embriões e filhotes machos de gaivota (*Larus argentatus*), que viviam no Lago Ontário, Califórnia, tinham ovidutos e ovários; pesquisas subsequentes mostraram que essa efeminização foi produzida por inseticidas, como o diclorofenol, kepone e metoxicloro. Foi observado também pares de gaivotas fêmeas dividindo o mesmo ninho entre populações de várias gaivotas, nos Grandes Lagos e na Enseada do Puget, no noroeste dos EUA, e entre andorinhas-do-mar rosadas ameaçadas de extinção.

Ainda que anormalidades observadas na saúde de animais silvestres evidenciassem uma disfunção endócrina como provável causa em poluentes ambientais nos anos de 1970 e tenha atraído certo interesse da comunidade científica, não ocorreu um despertar na área de saneamento básico. Poucos pesquisadores estudaram a persistência de hormônios esteróides nos esgotos brutos e tratados tais como TABAK e BUNCH (1970).

Neste mesmo período, trabalhadores do sexo masculino, em uma fábrica de produtos químicos começaram a apresentar contagens de espermatozóides extremamente baixas após terem sido expostos ao kepone, um produto químico usado como inseticida e matéria-prima para outros materiais (GUZELIAU *et al.*, 1976). O hormônio DES (dietilestilbestrol),

sintetizado pelo médico cientista Edwards Charles Dods, age no corpo como estrogênio natural. Esta droga foi utilizada como anticoncepcional. Entretanto, durante várias décadas, ela foi receitada durante a gravidez para prevenir aborto, mas foi recomendada também para gravidez normal, para suprimir a produção de leite da mulher depois da gravidez, para aliviar sintomas da menopausa, tratar câncer de próstata, etc. O crescente aumento de carcinoma vaginal, um câncer extremamente raro, em jovens com idade de 15 a 22 anos chamou a atenção da Medicina. Em abril de 1971 foi publicado um artigo em que se relatava que 7 entre 8 mulheres que tratavam de carcinoma vaginal eram filhas de mulheres que haviam tomado DES durante os três primeiros meses de gestação (HERBST *et al.*, 1971).

KOIFMAN *et al.*, (1974) relataram a exposição de organismos marinhos a compostos orgânicos contendo estanho, o tributilestanho (TBT) e o trifenilestanho (TPT), no litoral do Brasil (Rio de Janeiro, Fortaleza) e o desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos, fenômeno conhecido como "imposex".

McLACHLAN *et al.*, (1975) publicaram um artigo detalhando os estragos reprodutivos causados nos camundongos machos quando expostos ao DES antes do nascimento. Estudos subseqüentes mostraram que camundongos fêmeos apresentavam adenocarcinoma vaginal, quando expostos ao DES no período pré ou neonatal (NEWBOLD *et al.*, 1982).

Pesquisadores têm encontrado evidências de que a exposição pré-natal do homem ao DES ou a outros estrogênios pode tornar o feto susceptível a esses agentes químicos e tornar o adulto mais vulnerável a certos tipos de câncer de mama, útero, ovário, próstata e genitália; e ainda influenciar na orientação sexual (WINGARD *et al.*, 1993, PALMLUND *et al.*, 1993). Tem crescido o número de evidências científicas de que exposição a agentes químicos sintéticos danifica o sistema imunológico. Em estudos com camundongos, cientistas descobriram que a exposição a DES, antes do nascimento, altera o número de células T, as quais funcionam como defesa do corpo e podem destruir vírus ou células cancerígenas (COLBORN *et al.*, 1992).

Em meados de 1980, foi observada uma queda reprodutiva em jacarés que viviam no lago Apokpa, na Flórida. A quantidade de ovos das fêmeas que eclodiam era baixa e as pesquisas mostraram uma morfologia anormal do ovário, sendo o nível de estradiol do sangue

maior do que o normal; enquanto que muitos jacarés machos tinham pênis menor do que o normal, os juvenis mostravam uma concentração baixa de testosterona (GUILLETTE *et al.*, 1994, 1995 e BULL *et al.*, 1980). As tartarugas fêmeas que também viviam neste lago mostraram problemas reprodutivos, tais como: níveis elevados de estrogênios, ovários anômalos e reversão sexual (BERGERON, *et al.*, 1994).

Foi também nesse período que baleias beluga (*Delphinapterus leucas*), do estuário de São Lourenço, Canadá, começaram a aparecer mortas. BELAND *et al.* (1993) e MARTINEAU *et al.* (1987) fizeram muitas autópsias em baleias e observaram que elas tinham tumores malignos de mama, intumescências abdominais, úlceras na boca, estômago, esôfago e intestino, bem como desordens endocrinológicas. Estudando uma beluga macho observaram que era hermafrodita (possuía dois testículos e dois ovários). Analisando o teor de PCB em seu corpo, descobriram que ela tinha uma alta concentração desse possível disruptor endócrino.

Uma série de estudos foi realizada sobre populações em declínio de várias espécies de focas ontárias em uma grande extensão do mar do Norte, próximo das Costas da Holanda, Alemanha e Dinamarca. Pesquisadores observaram que as focas alimentadas com peixes contaminados das águas costeiras poluídas mostravam um comprometimento da reprodução em comparação com um segundo grupo alimentado com peixes de águas não poluídas (REIJNDERS *et al.*, 1986 e OSTERHAUS *et al.* 1988).

Nesta mesma década (1980), funcionários da Thames Water, concessionária de serviços de água e esgotos da Inglaterra, observaram casualmente que 5 % das carpas (*Rutilus rutilus*) que viviam em contato muito próximo das águas contaminadas pela descarga do efluente de ETE, no Rio Lea, eram hermafroditas (TYLER *et al.*, 1998). Esses peixes, como a maioria dos peixes de água de baixa temperatura, possuem apenas testículos ou somente ovários, e neles o hermafroditismo é raro. Mas, essa descoberta não foi então divulgada. Em meados dos anos 1980, o Departamento de Biologia e Bioquímica da Universidade de Brunel, Uxbridge, Inglaterra, juntamente com outros pesquisadores do Reino Unido, iniciaram um estudo completamente independente, para avaliar a fisiologia reprodutiva de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Observou-se que os machos desses peixes continham no seu plasma

quantidades mensuráveis de Vitelogenina (VTG), que é uma proteína, precursora da gema do ovo, normalmente produzida somente por fêmeas adultas. Na maturidade sexual (vários meses antes da desova), o fígado começa a produzir VTG, que é liberado na corrente sanguínea e transportado para os ovários, estimulando o desenvolvimento dos folículos. A produção dessa proteína é dependente do nível de estrogênio no sangue, que tem um importante papel no processo do desenvolvimento reprodutivo, incluindo a maturação e diferenciação sexual dos peixes fêmea (bem como em outros ovíparos vertebrados).

O fato dos peixes machos terem VTG no plasma foi um indicativo da presença de estrogênio na água, de acordo com pesquisas “*in vitro*”. Como a estação de pesquisa estava localizada abaixo de um ponto onde era lançado o efluente de uma estação de tratamento de esgoto doméstico, levantou-se a possibilidade de que tal efluente era a fonte dos estrogênios presentes no meio aquático (TYLER *et al.*, 1998).

Um estudo extensivo foi então empreendido por Purdon *et al.* (1994) para testar esta hipótese. Trutas arco-íris macho provenientes de águas não contaminadas foram confinadas em “gaiolas”, e colocadas em efluentes de ETE de origem doméstico ou industrial em 28 locais de 10 concessionárias diferentes em áreas da Inglaterra e País de Gales. Foi observado que em alguns locais de ensaio, as águas, ou o que elas continham foram mortais para a truta arco-íris. Nos locais onde os peixes sobreviveram, foi notado que todos possuíam de 500 a 50 000 vezes mais o nível de VTG no plasma. Nos peixes colocados em efluentes mais estrogênicos as concentrações de VTG no plasma excediam 100mg/ml, o qual é maior do que os níveis observados em fêmeas adultas. A intersexualidade observada nos peixes evidenciou que os efluentes de ETE continham compostos fortemente estrogênicos e que, provavelmente, contaminaram as águas dos rios.

Foi Purdon quem deu o primeiro sinal de que os efluentes de ETE são estrogênicos. Este pesquisador mostrou que trutas expostas por 10 dias a doses de 0,1 a 10ng/ml de 17 α etinilestradiol é um forte indutor de VTG, excedendo o efeito do estradiol. Estudos similares nos quais os peixes foram expostos a efluente de esgoto doméstico e ou água de rio foram feitos posteriormente na Alemanha, França, Estados Unidos, Inglaterra, Japão e Itália

(HYLLAND *et al.*, 1997, GIBSON *et al.*, 2005, OAKES *et al.*, 2005, KOBAYAH I *et al.*, VIRGANÓ *et al.*, 2001).

Confirmada a natureza estrogênica de efluentes de estações de tratamento de esgoto, uma série de novos estudos foi realizada por HARRIS *et al.* (1996, 1997) para determinar se a atividade estrogênica persistia a jusante do lançamento, em seis rios da Inglaterra, todos receptores de efluentes de ETE e basicamente de origem doméstica. Também nesse caso, trutas arco-íris foram utilizadas como teste, expondo-se alguns grupos e peixes machos em distâncias de até 5 km do ponto de descarga, por um período de três semanas. Em seguida, foram coletadas e analisadas amostras de plasma nos peixes machos. Os resultados obtidos mostraram uma alta concentração de VTG (de 25mg/mL até 52mg/mL) nesses peixes, e também uma redução de crescimento dos testículos. Isto tornou evidente que as atividades estrogênicas persistem ao longo do rio e não somente logo após a descarga dos efluentes de ETE.

Um extensivo estudo subsequente foi feito por JOBLING *et al.* (1998), com 2.000 peixes (tipo carpa), à montante e à jusante do lançamento de efluente de ETE nos rios. Os exames histológicos das gônadas dos peixes mostraram que eles ficaram hermafroditos, ou seja, tinham ovários e testículos, simultaneamente. Isto ocorreu numa proporção de 16 a 100% para os peixes à jusante das ETE; para aqueles que estavam à montante das ETEs a intersexualidade esteve entre 11,7 e 44%. Estes estudos evidenciaram também que a proporção de intersexualidade nos peixes estava correlacionada com a quantidade dos efluentes presentes nas águas dos rios estudados, o impacto de todas das ETEs sobre os locais de estudo foi descrito em termos de DBO₅ (demanda bioquímica de oxigênio) e a diluição média do efluente no rio. Trabalhos similares foram realizados por KRAAK *et al.* (1998), HYLLAND *et al.*, (1997), PETERS *et al.* (2001), DRASTICHOVA *et al.* (2005), entre outros, evidenciando que os estrogênios ambientais causam a intersexualidade em peixes .

DESBROW *et al.* (1998) realizaram outros estudos em efluentes de ETEs com tratamento primário, na Inglaterra, com o objetivo de identificar as substâncias estrogênicas presentes em efluentes de ETEs, e avaliar os seus efeitos tóxicos. Inicialmente, as amostras

dos efluentes foram filtradas e depois fracionadas com solventes de decrescente polaridade, seguindo-se uma avaliação da atividade estrogênica dessas frações, usando-se um meio de cultura que, na presença de estrogênio, libera uma enzima produzindo mudança de cor, indicando assim as frações com atividades estrogênicas. As amostras que possuíam estrogenicidade foram dissolvidas e fracionadas sucessivamente em coluna C18, até que os estrogênios pesquisados fossem extraídos e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Devido à complexidade da composição dos efluentes domésticos somente o 17 β -Estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e alguns compostos químicos alquilfenólicos foram identificados. Após identificação destes interferentes endócrinos no efluente de ETE, pesquisas “in vivo” foram feitas em tanques experimentais com trutas e carpas por um período de três semanas (ROUTLEDGE *et al.*, 1998), com a finalidade de observar a concentração tóxica para peixes. Estes foram colocados separadamente em aquários de 500L. Após um período de estabilização, as trutas arco-íris mostraram-se sensíveis à concentração de 1 – 10 ng/L de 17 β -estradiol, 25 a 50 ng/L de estrona e 3,0 ng/L de nonilfenol.

A magnitude das respostas vitelogênicas foi menor para carpas em relação às trutas, quando expostas às mesmas concentrações. O composto 17 α -etinilestradiol, em baixas concentrações, mostrou ser um potente indutor de VTG para as trutas, confirmando assim os estudos de PURDON (1994), mostrando que 0,1 ng/L é suficiente para elevar o nível VTG significativamente no plasma do peixe, por 10 dias de exposição.

Muitos estudos de identificação e quantificação de estrogênios em efluentes de ETEs e corpos de águas receptoras foram realizados em outros países como: Israel, EUA, Alemanha, Itália, Espanha, Canadá e Brasil, entre outros, e os resultados de alguns deles são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de substâncias estrogênicas identificadas em afluentes e efluentes de ETEs, rios e água de abastecimento, em diversos países segundo vários autores.

Países	Estrogênios e Xenoestrogênios					Fonte
	E ₁	E ₂	E ₃	EE ₂	NF	
Reino Unido	1,4 – 76ng/L ^c	2,7 – 48ng/L ^c		0,2 – 15ng/L ^c	23-53µg/L ^c	Desbrow- 1998
					0,1-3.7µg/L ^c 180 µg/L ⁱ	Johnson-2003
	6,4-28 ng/L ^c 0,2-8,5 ng/L ^s	1,6-7,4 ng/L ^c 0,5-7,0 ng/L ^s	2,4 ng/L ^c 1,2-3 ng/L ^s	n.d.		Xiao-Yao Xiao 2001
	15-220 ng/L ^c	35-308 ng/L ^c			3-10.7µg/L ^c	Tevor 2000
Alemanha	9-7 ng/L ^c	1 – 20 ng/L ^c		1-4 ng/L ^c		Desbrow 1998
	70 ng/L ^c 0.7-1.6 ng/L ^s	3ng/L ^c nd ^s		15 ng/L ^c nd ^s		Termes 1999 -rios e efluentes- ETE
	2,3 ng/L ^s	0,8-29ng/L ^s	3,0 ng/L ^s			Shore - 2003
E.U.A.		25 ng/L ^c		2000 ng/L ^c	0,1 µg/L ^c	Desbrow 1998
	27 ng/L ^s	9 ng/L ^s	19ng/L ^s	73 ng/L ^s	0,8-40 µg/L ^s	Kolpin-2002
					0,201 µg/L ^c	Feerguson- 2000
		0.2-2.6 ng/L ^s 0.7-3.7 ng/L ^c		0.2-0.5 ng/L ^s 0.2-0.76ng/L ^c	0.1-1.2 µg/L ^s 0.2-3.6µg/L ^s	Snyder-1999
	2,7ng/L ^c 25-132 ng/L ^a	0,4-3,5ng/L ^c 4-22ng/L ^a	0,5-11ng/L ^c 24-188ng/L ^a	0,3-1.7ng/L ^c 0,5-13ng/L ^a		Baronti 2000
					0.1-3,7µg/L ^s	Johnson- 2003
Canadá	0,5-52ng/L ^c 0,5-75ng/L ^a	0,5-6ng/L ^c 0,5-20ng/L ^a	0,7-28ng/L ^c 2-120ng/L ^a	0,5-2,2ng/L ^c 0,5-10ng/L ^a		Johnson,Belfroid 2000- ETE
	48 ng/L ^c	64 ng/L ^c		42 ng/L ^c		Termes-1999
Brasil	40ng/L ^c	20 ng/L ^c		6 ng/L ^c		Termes -1999
	4,13µg/L ^c 4,8 µg/L ^a 5µg/L ^s <3,3 µg/L ^t	5,56µg/L ^c 6,69 µg/L ^a 1.9 -3µg/L ^s 2,2 µg/L ^t		5,04µg/L ^c 5,81 µg/L ^a 1,2-1,7µg/L ^s 1,6 µg/L ^t	1,39µg/L ^c 1,87µg/L ^a <1,5µg/L ^s <1,5µg/L ^t	Ghiselli 2006
	6 – 343 µg/L ^s				0, 5- 664µg/L ^s	Solé-2000
	4,5 ng/L ^c	0,9 ng/L ^c		0,3–1,8 ng/L ^c		Belfroid- 1999
Holanda	0,4 -47ng/L ^c 18-140ng/L ^a	0,7-12ng/L ^c 9 – 48ng/L ^a	0,2 -1,8ng/L ^c 1,5 -8,8ng/L ^a		nd	Johnson,Belfroid 2000
					1,6µg/L ^c 0,6-3,0µg/L ^s	Ding 2001
Austrália	54 ng/L ^c	14 ng/L ^c		<5.0 ng/L ^c		Braga -2005

^cefluente de ETE.; ^a afluente de ETE; ^s água de superfície, ^t água de abastecimento, E₁ = estrona, E₂ = estradiol, E₃= estriol, EE₂=17α-etinilestradiol e NF= nonilfenol, nd= não detectado.

A toxicidade em efluentes de ETEs do Reino Unido tem mostrado que 80% da atividade estrogênica é atribuída aos estrógenos natural e sintético. Como os efluentes das ETEs inglesas analisados foram principalmente de origem doméstica, provavelmente, o estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol seja derivado de pílulas anticoncepcionais, uma vez que elas são excretadas pela urina (de forma conjugada) e pelas fezes (não conjugada). Tem sido sugerido que estes estrogênios conjugados na forma de glicoronídeos sejam eliminados pela urina e transformados em sua forma biologicamente ativa antes ou durante o processo de tratamento de esgoto. Esta observação é sustentada no fato de que a bactéria *Escherichia coli*, comumente encontrada em esgotos, sintetiza a enzima β -glucoronidase (PURDON *et al.*, 1994), que é responsável pela hidrólise do estrogênio, desconjugando-o.

A maior fonte dos hormônios naturais 17 β -estradiol e estrona são atribuídas à própria mulher, haja vista que durante o ciclo de reprodução feminino é excretado entre 10 e 100 μ g de estrogênio diariamente, sendo que a mulher grávida excreta até 30 mg de estrogênio por dia (ROUTLEDGE *et al.*, 1998).

A Tabela 2 mostra as estimativas de quantidades diárias excretadas de estrogênios naturais 17 β estradiol (E2), estrona (E1), estriol(E3) e a quantidade de 17 α -etinilestradiol (EE2) nas pílulas orais contraceptivas.

Tabela 2: Excreção diária (μ g) per capita de estrógenos por humanos.

Categoria	Estrona	Estradiol	Estriol	Etinilestradiol
	E1	E2	E3	EE2
Homens	3.9	1.6	1.5	-
Mulheres menstruando	8	3.5	4.8	-
Mulheres na menopausa	4	2.3	1	-
Mulheres grávidas	600	259	6000	-
Mulheres (uso anticonc.)				35

Fonte: Bila, 2007

O processo metabólico do 17β -estradiol no corpo é similar ao 17α -etinilestradiol que é excretado de forma conjugada, e a presença desses estrogênios livres no meio aquático resulta, provavelmente, da desconjugação por bactérias no ambiente. A exposição aos hormônios sintéticos tem sido associada ao câncer vaginal (TAKAI e TSUTSUMI, 2000)

Outro contaminante examinado em efluente de tratamento de esgoto foi o alquilfenol e seus derivados polietoxilados. Pesquisas têm mostrado que PVC, detergentes, defensivos agrícolas e produtos de higiene pessoal podem dar origem ao nonilfenol (ROUTLEDGE *et al.*, 1995, SOTO *et al.* 1987, 1991,). Os nonilfenóis e compostos relacionados são produtos da degradação microbiológica dos alquilfenoletoxilados, que pode ocorrer durante o tratamento na ETE. Esses produtos químicos presentes no meio aquático têm sido estudados nas águas oriundas de ETE (JOBILING, *et al.* 1993), e são considerados contribuintes potenciais para as disfunções endócrinas observadas nos peixes.

Os estudos relacionados aos agentes que causam a feminilidade em peixes nos rios ingleses têm sido focalizados no estrogênio. Entretanto, um efluente pode conter uma grande variedade de estrogênios, que são hormônios naturais, hormônios sintéticos, e também substâncias químicas que mimetizam hormônios, como por exemplo: alquilfenóis, ftalatos, pesticidas e outros. A alta concentração desses xenoestrogênios no meio ambiente pode persistir por longo período de tempo, visto que sua decomposição geralmente é lenta. Além disso, muitos xenoestrogênios são lipofílicos (dissolvem-se em gorduras) e são bioacumulativos.

Os resultados obtidos em estudos dos rios e ETEs inglesas causaram um ressurgimento das pesquisas em termos mundiais sobre os produtos químicos estrogênicos e androgênicos, surgindo então o termo “endocrine disrupter” (SNYDER, *et al.* 2002) e despertando a consciência da comunidade científica na área do Saneamento Básico. A figura 4 mostra o crescimento anual de publicações contendo o termo “disruptores endócrinos” desde que foi publicado pela primeira vez em 1992 (CORLBORN e CLEMENTE), embora muitos artigos de relevância tivessem sido publicados, mas que não contivessem o termo.

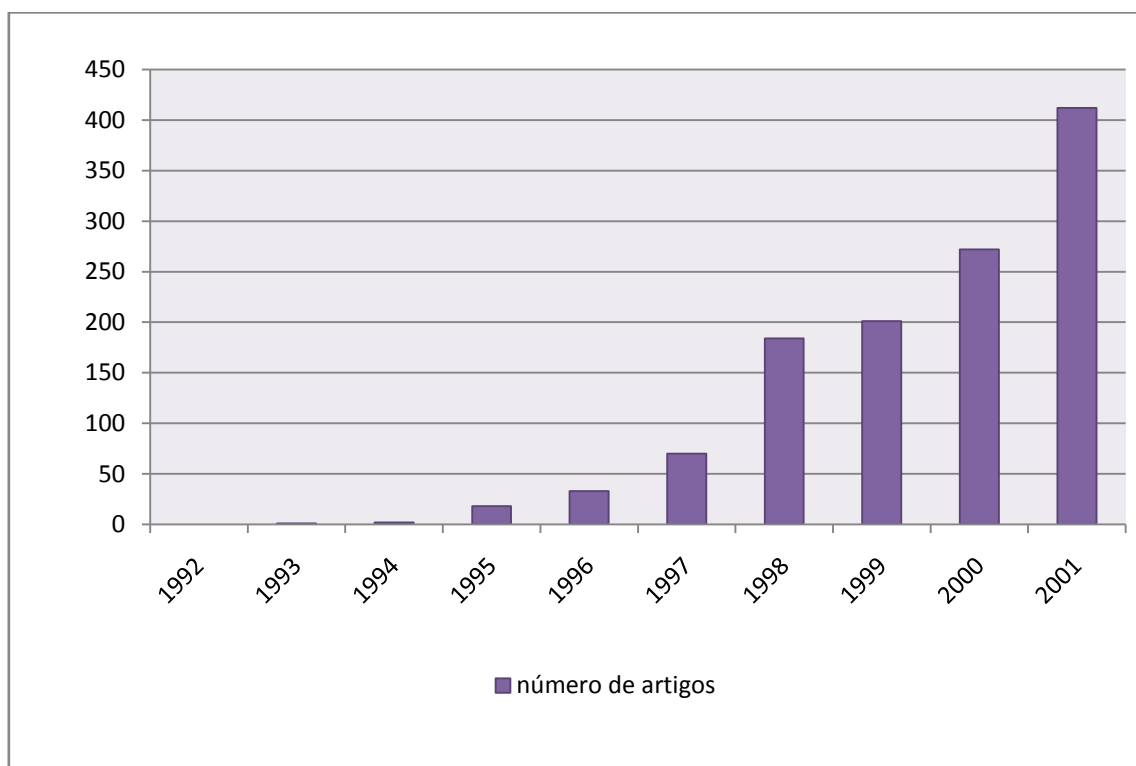


Figura 4: Crescimento anual do uso do termo disruptores endócrinos (PENALOPE 2003)

Em 1992, uma equipe de pesquisadores do Departamento de Reprodução e Desenvolvimento do Hospital Universitário e o Instituto Panum, Copenhague, Dinamarca, publicaram no *British Medical Journal* um estudo em relação à diminuição significativa do volume de espermatozoides nos homens, no período de 1938 a 1992: em 1.351 amostras de espermatozoides de voluntários da Bélgica, França, Dinamarca e Grã-Bretanha, verificou-se que a quantidade média de espermatozoides reduziu 45% (2,1% ao ano), de 113 milhões de espermatozoides por mL para 66 milhões de espermatozoides por mL. O volume de sêmen diminuiu de 3,4 mL para 2,75 mL. Além disso, verificou-se que a mobilidade dos espermatozoides também diminuiu. A incidência de câncer de testículos tem aumentado durante este mesmo período de tempo. A incidência de hipospadias (má formação do pênis ou bolsa escrotal) e criptorquidismo (testículos escondidos) também parece ter aumentado (TOPPARE *et al*, 1996).

Na Espanha, de 1977 a 1995, observou-se uma queda na quantidade ejaculada, de 336 milhões para 258 milhões de espermatozoides (SANTAMARTA, *et al* 2001). Nos últimos 30

a 50 anos houve uma queda de 1 a 3% na quantidade de espermatozóides em homens da América do Norte (SHARPE, *et al* 1998). Os problemas reprodutivos similares em animais silvestres sugerem que estas mudanças podem estar inter-relacionadas e podem ter um efeito comum de origem fetal ou infantil. Exposição do feto macho a nível anormal de estrogênios tal como o DES pode resultar nos defeitos mencionados anteriormente (TOPPARI *et al* 1996).

O fato de que os compostos DE serem excretados por humanos e lançados no ambiente via esgotos ou efluente de ETE e terem impactos significativos na biota exposta no ambiente aquático e, provavelmente, na saúde humana, tem chamado a atenção e despertado a consciência da comunidade científica voltada ao Saneamento Básico. Também o avanço de técnicas analíticas para detecção em nível de partes por trilhão de compostos orgânicos, muito tem contribuído para que na última década milhares de artigos fossem publicados sobre diferentes aspectos dos DE. Como este ainda é um tema aberto, muitas investigações continuam sendo feitas.

Um grupo de pesquisadores (DAVIS *et al.*) propôs, em 1993, a teoria de que agentes químicos sintéticos com atividade hormonal estariam causando o aumento na incidência do câncer e nas mortes entre mulheres mais idosas pelo aumento de sua exposição geral a estrogênio. No início do século XX a endometriose era uma doença quase desconhecida. Hoje ela afeta cinco milhões de mulheres norte-americanas. Estas mulheres têm níveis mais elevados de PCB no sangue do que as mulheres que não apresentam a enfermidade. Mas a tendência mais alarmante é a crescente taxa de câncer da mama, que é o câncer feminino mais comum (SANTAMARTA, *et al* 2001). Estas e outras observações provêm indícios de que os aparentes declínios de saúde reprodutiva humanas podem ser causados por fatores ambientais (TOPPARI *et al.* 1996). Embora SHARPE *et al.* (2003) enfatizem a clara evidência de que a disfunção endócrina tenha papel central nas desordens reprodutivas observadas, muitos fatores podem causar uma disfunção (disfunção) endócrina, além de fatores ambientais: defeitos genéticos, estilo de vida maternal, estrogênio exógeno maternal e desequilíbrio hormonal.

Em 1995, a problemática dos estrogênios passou a ser objeto de política pública dos Estados Unidos. Uma emenda da EPA na legislação sobre a qualidade da água potável exigiu

que se conhecesse o potencial de atividade endócrina de um produto químico antes do mesmo ser manufaturado ou usado em processos que pudessem contaminar a água ou os alimentos. Para isto a EPA tem desenvolvido um programa estratégico para testar e avaliar a atividade endócrina de quase 80.000 produtos químicos comerciais (PATLAK *et al.* 1996).

A primeira ação da União Européia sobre os disruptores endócrinos ocorreu de 2 a 4 de dezembro de 1996, num *workshop* com o tema “o impacto dos disruptores endócrinos na saúde humana e de animais silvestres”, realizado em Weybridge, Reino Unido, onde se definiu

“Um disruptor endócrino é uma substância exógena, que causa efeitos adversos à saúde no organismo intacto, ou no seu progenitor, em consequência da quebra da função orgânica” (EUROPEAN COMMISSION, 1996).

Nesta ocasião, produtos químicos de relevância foram identificados como prováveis disruptores endócrinos: a) organohalogênicos (porex, dioxinas, PCB, etc), b) bisfenol A, ftalatos e alquilfenóis, c) esteróides d) pesticidas, e) fitoestrógenos. Ainda nesse encontro ficaram estabelecidas como prioridades análises de efluentes de ETE (doméstico e industrial) e os efeitos de água de superfície e de sedimentos para os peixes. Milhares de produtos químicos são lançados diariamente no meio ambiente. A cada ano 1.000 novas substâncias químicas sintéticas são lançadas no mercado em todo mundo e a lista de substâncias suspeitas de

A União Européia listou 564 substâncias químicas suspeitas de serem disruptores endócrinos, sendo que 66 foram identificados como prioritários (JOHNSON *et al.*, 2003, RIBEIRO *et al.*, 2006). As substâncias classificadas como DEs (tabela 3), usadas ou produzidas para uma infinidade de finalidades, podem ser agrupadas em duas classes:

1. substâncias sintéticas: utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas; utilizadas na indústria e seus subprodutos, como dioxinas, PCB, alquilfenóis e seus subprodutos, HAP, ftalatos, bisfenol A, metais pesados, entre outros; compostos farmacêuticos, como os estrogênios sintéticos, DES e etinilestradiol.

2. substâncias naturais: fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrogênios naturais estradiol, estrona e estriol. A tabela 3 mostra alguns destes compostos e seus usos.

Tabela 3: Compostos e classes de compostos conhecidos ou suspeitos de serem disruptores endócrinos.

Disruptores Endócrino	Fontes e uso primário
1. SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS	
1.1 Pesticidas	
1.1.2. Herbicidas	
2,4 Diclorofenol	Herbicida e fungicida
Atrazina	Triazine herbicida
Vinclosolina	fungicida para morango,uva e outras frutas
1.1.3. Inseticidas	
α -BHC	Inseticida
β -BHC	Inseticida
δ -BHC	Inseticida
γ -BHC	Inseticida
DEET	Repelente de insetos
Dicofol	Inseticidas organoclorados
Dieldrin* e Aldrin*	Inseticidas organoclorados
DDT* e metabolitos DDE	Inseticidas organoclorados
Metoxicloro	Inseticidas organoclorados
Clorodecano (Kepone)	Inseticidas organoclorados
Toxofeno	Inseticidas organoclorados
Heptacloro*	Inseticidas organoclorados
Endosulfan	Usado na agricultura na Espanha e América latina
Mirex	Inseticida para matar formiga
Penconazol	Fungicida
Propiconazol	Fungicida
Epoxiconazol	Fungicida
Procimidona	Fungicida
Tridemorfos	Fungicida
Carbendazime	Fungicida
α Clordano* e γ Clorordano*	Inseticidas organoclorados
Procloraz	Inseticidas organoclorados

Disruptores Endócrinos (continuação)	Fontes e uso primário
1.2.1. Bifenilpoliclorados (PCB)*	
Tricloro-4-difenil (mistura de isômeros)	Adesivos, graxas
Tetracloro-4-difenil (mistura de isômeros)	Adesivos, graxas
Estireno	Usado na produção de da borracha sintética
1.2.2. Dioxinas e furanos*	
Di-benzenodioxina Di-benzenofurano	Bioprodutos da incineração de processo químicos industriais como branqueamento do papel. Usado como conservante de madeira.
1.2.3. Halogenados	
Di-metilftalato (DMP)	
Di-etilftalatos (DEP)	
Bi-fenil polibromado	Retaliador de chama
Tri(2-cloroetil)fosfato (TCEP)	Retaliador de chama
Di-isobutilftalatos (DIBP)	
Di-n-butil ftalato (DBP)	Embalagem plástica de alimentos, elásticos,repelente
Butil-benzilftalato (BBP)	Plástico para produção de piso de vinil
Di-isooctil-ftalato (DIOP)	Aditivo de plásticos ,produtos de beleza
Di-iso-decil-ftalato (DIDP)	Aditivo de plásticos ,produtos de beleza
2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47)	Retaliador de chama
2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE 99)	Retaliafor de chama
2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE 100)	Retaliador de chama
2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE 153)	Retaliador de chama
2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154)	Retaliador de chama
Octabromodifenil éter (BDE octa)	Retaliador de chama
Decabromodifenil éter (BDE 209)	Retaliador de chama
Hexabromociclododecano (HBCD)	Retaliador de chama
tetrabromobisfenol A (TBBA)	Retaliador de chama
1.2.4. Parabenos	
Benzilparabeno	Conservantes, alimentos,produto de beleza etc
Isobutilparabeno	Conservantes, alimentos,produto de beleza etc
n-propilparabeno	Conservantes, alimentos,produto de beleza etc
Etilparabeno	Conservantes, alimentos,produto de beleza etc
1.2.5. Alquilfenóis	
4-Nonilfenol	Aditivos para óleos lubrificantes, detergentes, resinas, plástico.

Disruptores Endócrinos (continuação)	Fontes e uso primário
4-octilfenol	Detergentes, tinta, herbicidas
octilfenoletoxilado	Detergentes, tinta, herbicidas
Difenol A (BPA)	Fabricação de plásticos policarbonatos, resinas
Naftol – 1	Produção de antioxidantes , tinturaria, e perfumes
Naftol – 2	Produção de antioxidantes , tinturaria, e perfumes
6-bromo-2-naftol	Produção de antioxidantes, tinturaria, e perfumes
1.2.6 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPA)	
Benzopireno	Combustão fósil
5,6,7,8-Tetraidronaftol-2	
3,9-Diidroxi-dimetilbenzoantracenos	Combustão fósil
Acenafteno	HPAs- Combustão madeira, lixo, ativ. industriais
Antraceno	HPAs
Benzo[a]antraceno	HPAs
Benzo[a]pireno	HPAs
Benzo[k]fluoranteno	HPAs
Benzo[g,h,i]perilene	HPAs
Dia,h]antracnobenzo[	HPAs
Naftalina	HPAS
Fluoreno	HPAs
Indeno[1,2,3cd]pireno	HPAs
naftaleno	HPAs
Fenantreno	HPAs
Pireno	HPAs
1.2.7. Organo metálico	
Tributiltin (TBT)	Usado em pinura de embarcações estruturas marítimas, pra evitar crescimento de algas.
3. Fármacos	
Dietilestilbestrol (DES)	Contraceptivo oral, terapia câncer próstata
17 α -etinilestradiol	Contraceptivo oral
Tamoxifen	Terapia câncer de mama
Poliestradiol fosfato	Contraceptivo oral
Sulfato estrona piperazina	Contraceptivo oral
Quinestrol	Contraceptivo oral

Disruptores Endócrinos (continuação)	Fontes e uso primário
Dienestrol	Terapia hormonal de estrógeno
Acetaminofen	Analgésico
Cafeína	Estimulante
Carbamazepina	Analgésico
Diazepan	Antidepressivo
Diclorofenaco	Ani-reumatóide
Dilatim	Anti-convulsivo
Eritromicina- H ₂ O	Antibiótico
Estradiol	Esteróide
Estriol	Esteróide
Estrona	Esteróide
Ibopofen	Analgésico
Iopromide	Contraste de RX
Meprobamate	Atidepressivo
Naproxem	Analgésico
Pentoxifilina	Controle da viscosidade do sangue
Fluoxitina	Anidepressivo
Genfibrosil	Anti-colesterol
Progesterona	Esteróide
Sulfametoxasol	Anibiótico
Tricosam	Antibiótico
Testoterona	Esteróide
Trimetropim	Antibiótico
Hidrocodona	Analgésico
Cimetidina	Histamina H ₂ -receptor antagônico

4- Produtos de uso pessoal

Galaxolida	Musk (fragância)
Naftaleno	Fragrância
Oxibenzeno	Protetor sola
2 – SUBSTÂNCIAS NATURAIS	
2. 1 Estrógenos natural	
Estrona	Hormônio natural
17 β estradiol	Hormônio natural

Disruptores Endócrinos (continuação)	Fontes e uso primário
Coumestrol	Alfafa
Genisteína	Soja
Daidzeína	Soja
Equol	Um metabólito do coumestrol, genisteína e daidzeína
Formononetina	Trevo vermelho, alfafa
Biochanina A	Trevo vermelho, alfafa
Pelargonina	Flores da <i>Pelargonium zonale</i>
Indolo[3,2-b]carbazole	Vegetais da <i>Brassica genus</i>
Mirestrol	Produto natural
2.3. Micoestrógenos Zearalenone Zeranol	Milho, trigo, cevada, e outras rações animais Agente anabólico vegetal
2.4 Metais Pesados	
cádmio	
mercúrio	
chumbo	

Fonte: LIEHR *et al.* (1998), JOHNSON *et al.* (2003), WESERHOFF (2005), NORIEGA *et al.* (2005), BILA *et al.* (2007).

Embora o **DDT** tenha sido banido em muitos países, ainda persiste o seu uso na África, Ásia Tropical e alguns países da América Latina. Os registros alfandegários mostraram que aproximadamente uma tonelada de DDT por dia foi embarcada dos EUA em 1992. O DDT e os produtos de sua degradação são bioacumulativos e persistentes no meio ambiente e os tecidos humanos ainda apresentam concentrações significativas destes disruptores endócrinos (COLBORN *et al.*, 1976). Estudos revelam detecção de 0,21 ng/L de DDE (metabólito do DDT) e 0,15 ng/mL de PCB em amostras de líquido amniótico. FOSTER *et al.* (2000) concluíram que aproximadamente um em cada três fetos da região de Los Angeles, na Califórnia, eram expostos ao DE, com consequências ainda desconhecidas.

Quanto ao **PCB** (bifenila policlorada), embora tenha sido banido o seu consumo, dois terços do que foi produzido ainda está em transformadores e outros equipamentos elétricos. Em 1996, no Rio de Janeiro, moradores de uma favela destruíram transformadores do metrô

carioca e retiraram o fluido neles contido, conhecido como “ascarel”, e utilizaram-no como óleo de cozinha e como bronzeador. Os PCBs têm se mostrado como um agente químico altamente estrogênico, bioacumulativo e persistente (MYAMOTO *et al.*, 1998). Assim como as dioxinas e furanos, os PCB são agonistas e, em experimentos *in vivo* e *in vitro* têm uma ação anti-estrogênica (JOHNSON *et al.*, 2003). Das 209 possíveis espécies de PCBs que são referenciadas como congêneres, pelo menos 113 estão presentes no meio ambiente (CASTRO 2002). Os PCBs são encontrados principalmente em sedimentos, solo e tecidos animais. Altas concentrações (57µg/Kg de PCB e 101µg/Kg de dioxinas e furanos) têm sido encontradas em lodos de ETE. De 1960 a 1970, KUMAR *et al.* (2001) mediram a concentração de dioxinas e PCB em tecidos humanos (170 a 1300 pg/g) e em galinhas, golfinhos, cabras, pássaros e peixes.

A acumulação desses compostos em água é rara devido a sua baixa solubilidade, mas o seu potencial bioacumulativo ao longo da cadeia alimentar pode ser importante, especialmente ao longo da vida animal (JOHNSON *et al.*, 2003).

Os alquilfenóis polietoxilados (**APEOs**) são surfactantes não iônicos amplamente usados desde a década de 1940, em produtos de limpeza doméstica, em manufaturas de plásticos como poliestireno e PVC e como defensivos agrícolas. O nonilfenol é produto de biodegradação dos APEOs e é muito usado como intermediário na formação de muitos produtos químicos, tais como resinas fenólicas, antioxidantes, nonilfenol e seus etoxilados, que são empregados na formulação de alguns pesticidas. Outras fontes de exposição direta dos alquilfenóis são através do uso de produtos pessoais, como maquiagem, cremes, produtos para cabelo e banho. O interesse ambiental pelos APEOs aumentou desde que Giger e colaboradores descobriram que esse composto e/ou seus metabólitos não eram removidos no tratamento convencional de esgoto e persistiam no ambiente aquático (FERGUSON *et al.* 2001). Os APEOs têm propriedades surfactantes e emulsionantes, são usados como detergentes, aditivo de formulação de plastificantes e como aditivo na manufatura de couro e têxtil (MYAMOTO, *et al.*, 1998). Apesar dos produtos de consumo como o detergente não serem intrinsecamente estrogênicos, estudos demonstraram que bactérias encontradas no corpo humano e em instalações de esgoto degradam os APEO em nonilfenol e outros agentes, que mimetizam estrogênios. Casualmente, SOTO *et al.* (1985) descobriram que os tubos de ensaio

de poliestireno que usavam em seus experimentos com células de mamas cancerosas continham nonilfenol, o agente químico responsável pela proliferação celular, agindo como se fosse um estrogênio. Os alquilfenóis são persistentes e acumulativos nos organismos vivos.

O bisfenol A (**BPA**) é um monômero do plástico policarbonato que também pode ser um distruptor endócrino. Grupo de pesquisadores da Faculdade de Medicina de Stanford, em Palo Alto, Califórnia, também descobriram casualmente, que os frascos usados no laboratório para esterilizar a água utilizada nas experiências de células cancerosas, liberavam o bisfenol A que mimetizava estrogênio (KRISHNAM, *et al.*, 1993). Este agente químico é muito usado como plastificante dos recipientes dos alimentos. Estudos em 20 marcas de alimentos enlatados nos EUA e na Espanha constataram a presença do bisfenol A em cerca de 50% dos alimentos em consumo analisados, por exemplo, milho, alcachofra e ervilhas (BROTONS, *et al.*, 1995). Por ter uso doméstico e industrial, o bisfenol A também pode ser encontrado no esgoto doméstico, efluente tratado e lodo biológico de ETE.

Estudos *in vitro* indicam que o BPA é 10.000 a 30.000 vezes menos potente que o estradiol. A concentração de 5µ/L causou a superfeminização em peixes (JOHNSON *et al.* 2003). A concentração ambiental de BPA em efluentes de ETE doméstico observada no Canadá, Alemanha, e Japão é de 0,15 a 0,03 µg/L. A concentração em efluentes ETEs estão abaixo 1,5 µg/L.

Os ftalatos são muito usados em manufaturas de plástico e em muitas outras categorias industriais. Os ftalatos com maior evidência de estrogenicidade *in vitro* são butilbenzilftalato (BBP), dibutilftalatos (DBP) e di(2etilhexil)ftalatos (DEHP), com potência *in vitro* de 10^{-5} a 10^{-8} comparada com estradiol. Entretanto, estes resultados *in vitro* não foram reproduzidos *in vivo*. Concentração alta de 5mg/L de DEHP não mostrou efeitos observáveis em peixe Medasca japoneses. Estudos em efluentes de ETE da Alemanha e Reino Unido detectaram DBP < 1 a 14 µg/L; BBP < 1 a 2,8 µg/L; e DEHP < 2,4 a 182 µg/L. O teor de ftalatos no lodo de ETEs no Canadá, EUA, Alemanha e Suíça foram: DEHP 21 a 230 mg/Kg; BBP 0,3 a 10,1 mg/Kg; DBP 0,2 a 17mg/Kg. Em água de superfície foram observados valores abaixo de 1 µg/L para o DBP e BBP, mas estudos na Alemanha mostraram concentrações maiores: 0,3 a 98 µg/L de DEHP e 0,12 a 8,8 µg/L de DBP em água de superfície. Embora alguns desses

valores excedam o nível de toxicidade, não há evidência de efeitos endócrinos neste nível (JOHNSON *et al.* 2003).

O Tributilestanho (TBT) é um herbicida usado como agente antialgas incorporado em tintas. A masculinização de vários invertebrados marinhos tem sido associada à exposição a TBT. Estes efeitos podem ser observados em 1ng/L. Seu uso em tintas para pinturas de embarcações marítimas foi proibido pela Organização Marítima Internacional em 2003 e requer que tintas velhas sejam removidas ou cobertas até 2008. O uso de TBT para preservação de madeira pode aumentar a contaminação ambiental, inclusive do solo. Concentrações que variam de 100 a 3.000 ng/L têm sido encontrada em portos na Alemanha e Canadá. O nível de TBT permanece inaceitável e alto em muitos lugares (JOHNSON *et al.* 2003).

Certas plantas também contêm compostos naturais que imitam hormônios estrogênicos e são chamados de fitoestrogênios (MAZUR *et al.*, 1998). Estes incluem dois principais grupos: isoflavonas e lignanas. Desordens reprodutivas foram observadas em ovelhas que se alimentaram por períodos prolongados de tempo com plantas (trevo vermelho) que continham isoflavona genisteína, biochanina A e formonoetina e desenvolveram sintomas de infertilidade (ADAMS, *et al.* 1998). Estudos em camundongos fêmeas comprovaram esse potencial estrogênico a Zearalalenona, uma microtoxina produzida por fungo presentes em alimentos embolorados, como milho, algodão, cevada e o β -sisterol, encontrado em óleos vegetais, legumes e na madeira (LINTELMANN 2003). Entretanto, muitos desses fitos hormônios têm se mostrado benéficos para o homem.

Estudos recentes têm indicado que soja, alfafa, verduras e grãos possuem isoflavonóides como daidzeína, genisteína e outros, que podem agir como fito-hormônio naturais inibindo o crescimento de tumores malignos, prevenindo e diminuindo a incidência de câncer da mama e problemas reprodutivos masculinos (BINGHAM, *et al.* 1998, WANIBUCHI *et al.* 2003). Pesquisadores têm acreditado que estrogênios vegetais podem ter um efeito protetor porque são mais fracos que estrogênios naturais produzidos pelo organismo animal. SAITO *et al.* (2000) revelaram em seus estudos que a genisteína, estrógeno encontrado na soja, inibe significativamente a formação de nódulos na próstata.

A presença de fármacos no meio aquático tornou-se um grande problema. Após a administração e eliminação, as drogas vão para o ambiente aquático, modificando o seu equilíbrio ecológico. Recentemente, o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem freqüentemente encontradas em efluente de ETE e águas superficiais em concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L . Muitos estudos têm sido publicados sobre esses contaminantes em efluente de ETE, água de superfície e água tratada (TERMES *et al.* 1998, KOLPIN *et al.* 2002, WESTERHOFF *et al.*, 2005, Braga -2005, , GHISELLI 2006, KIM *et al.*, 2007).

Após a administração, uma parte significativa dos fármacos é excretada por humanos no esgoto doméstico. Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas ETEs. Além disso, muitos fármacos residuais resistem a vários processos de tratamento convencional de água. Em todo mundo, fármacos, tais como, antibióticos, hormônios, anestésicos, antitérmicos, meios de contraste de raio X, entre outros, foram detectados no esgoto doméstico, em águas superficiais e subterrâneas.

Os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas para servir a um propósito terapêutico. Cinquenta a noventa por cento de uma dosagem do fármaco é excretado inalterado e persiste no meio ambiente (BILA 2003). O uso desenfreado de antibióticos acarreta dois problemas ambientais: um, a contaminação dos recursos hídricos e outro, microorganismos que criam resistência a esses fármacos. As bactérias podem fazer, e freqüentemente o fazem, mudanças no seu material genético, adquirindo resistência aos fármacos. Assim, uma bactéria presente em um rio que contenha traços de antibióticos pode adquirir resistência a essas substâncias. Algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicadas na medicina humana e veterinária, no entanto não se tem registro da quantidade exata na literatura (BILA 2003).

O Lago Mead é o maior reservatório de água doce dos EUA, sendo que mais de 25 milhões de pessoas dependem desse manancial para uso doméstico e agrícola. Foi observado (1996) também que as carpas que viviam no Canal de Las Vegas (águas que abastecem o lago

Mead) mostraram quantidade significativa de VTG no plasma. Por esta razão, em 1997, bioensaios e subsequente análise instrumental de alta resolução foram realizados para avaliar e identificar a toxicidade da água deste reservatório. Os resultados também mostraram que os estrogênios 17 β -estradiol (natural) e o 17 α -etinilestradiol (fármaco sintético) foram os responsáveis pela atividade estrogênica da água do lago Mead (SNYDER *et al.* 2002).

TORRES *et al.*(2002) investigaram a concentração e destino de pesticidas, bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) na bacia hidrográfica Rio Paraíba do Sul/Guandu, importantes mananciais do Estado de S. Paulo água usados no abastecimento público. Os resultados indicaram que poluentes industriais, principalmente os HAP, foram encontrados na água e em sedimentos.

A toxicidade de efluentes de ETEs tem sido avaliada através da análise *in vitro* e na qual se faz um ensaio com um receptor ligado a um gene informante onde a atividade estrogênica é medida em equivalente a Estradiol (E2eq). Por exemplo: concentração de Estrona = 0,5 E2eq (tabela 4). Isto quer dizer que o E1(Estrona) tem a metade da potência estrogênica em comparação com o E2(Estradiol).

Tabela 4: Relação da concentração dos DE em efluente de ETE e impacto potencial em animais selvagens.

DE	E2 eq in vitro	Concentração Típica do efluente.	Efluente típico previsto in vitro em ng/LE2eq	Resposta em VTG em truta in vivo – ng/LE2eq	E2 eq típico previsto in vivo
E1	0,5	5 ng/L	2,5	0.5	2,5
E2	1	1,5 ng/L	1,5	1	1,5
E3	0,005	20 ng/L	0,1	0,001	0,02
EE2	1 a 2	0,5 ng/L	0,5-1	25	12
NP	0,0001	2.000ng/L	0,2	0,001 a 0,0006	2
Total			5,5		18

Fonte: JOHNSON *et al.* 2001.

Segundo JOHNSON *et al.* (2001), os estrógenos esteróides e o estrógeno alquilfenol podem ter efeitos aditivos e é possível prever impacto de cada DE baseado na concentração “típica” do efluente (tabela 4). Assim, se o efluente típico possui 5 ng/L de E1 (metade de E2) isto equivale a 2,5 ng/L de E2 no efluente. Do mesmo modo é possível prever o E2eq *in vivo* da concentração típica do efluente. A atividade estrogênica final do efluente ‘típico’ *in vitro* é 5,5 ng/L de E2eq e *in vivo* é 18 ng/L de E2eq. GIBSON *et al.* (2005), mostraram que a atividade estrogênica final de efluentes ETE está entre 0,03 a 100ng de E2eq/L.

JOHNSON *et al.* (2001) classificaram a potência estrogênica de E1, E2, E3, EE2 e NP da seguinte forma:

E1. Embora E1 possa ter somente a metade da potência do E2 *in vitro e in vivo* (tabela 4), ele é frequentemente encontrado em maior concentração, pelo menos o dobro de E2 em efluentes de ETE. Logo é considerado um DE em potencial.

E2. É um disruptor endócrino de grande potência estrogênica encontrado em efluentes de ETE e água de superfície em baixa concentração.

E3. É um disruptor endócrino de baixa potência estrogênica comparado com os outros esteróides e tem sido encontrado em efluentes de ETEs em baixa concentração. Portanto, é considerado DE fraco.

EE2. Com base em sua potência *in vitro* e sua baixa concentração, o EE2 não seria considerado um disruptor endócrino relevante em efluente de ETE; entretanto, segundo estudos *in vivo* (LANGE *et al.*, 2001), o EE2 é um estrógeno extremamente potente, sendo considerado o mais importante DE em efluente de ETE.

Estudos de FOLMAR *et al.* (2000) mostraram que EE2 é 10 vezes mais potente que E2 para induzir VTG em peixes machos. THORPE *et al.* (2003), em estudos para investigar a potencia relativa de E1, E2 e EE2 e para verificar o efeito da mistura binária de E2 e EE2 colocaram peixe truta juvenil nessa mistura por 14 dias para verificar a potência estrogênica através da indução de VTG e observaram que a mistura foi mais potente do que os estrógenos

individuais e que o EE2 é 11 a 27 vezes mais potente do que E2, e este é 33 a 66 vezes mais potente do que E1. A alta potência de EE2 combinado com sua persistência no ambiente, comparada com estrógeno natural e sua capacidade bioacumulativa (em truta) sugere que EE2 é provavelmente o estrógeno de maior importância. PAWLOWSKI *et al.* (2004) estudaram os efeitos 17 α -etinilestradiol em peixes medaka, *Oryzias latipes* adultos de ambos os sexos, expostos por 21 dias e observaram que 1 ng/L era suficiente para induzir VTG nesta espécie de peixes.

NP. Testes *in vitro* mostram que NP é um estrógeno 1.000 a 10.000 vezes menor que E2 (ROUTLEDGE *et al.* 1997). Neste caso, o NP não teria um papel importante como DE, mas como eles estão presentes em concentração que excede a 1 μ g/L, estudos *in vivo* (ROUTLEDGE *et al.*, 1998) indicam que o seu impacto seria igual ou maior que E1 e E2. O Nonilfenol também é fracamente estrogênico para pássaros e produz efeitos adversos como: diminuir o tamanho do testículo e a espermatogese em ratos (FIELD *et al.* 1996).

Mais recentemente, GIBSON *et al.* (2005) investigaram a natureza das misturas de componentes estrogênicos em bÍlis de peixes expostos por 10 dias à água de torneira, água de rio e em dois efluentes (A e B) de ETE. As concentrações no efluente A foram de 195 ng/L de E1, 38,9 ng/L de E2, 7,9 ng/L de EE2 e no efluente B, foi 0,3 ng/L de E1, 0,8 ng/L de E2 e 1,1 ng/L de EE2. A atividade estrogênica do efluente A variou de 26 a 99 ng de E2eq/mL e do efluente B 5 ng de E2eq/mL durante o período de estudo. Os peixes foram sacrificados e o tecido removido para análise química. Aqueles expostos à água de torneira e em água do rio continham quantidade baixa de E2 e E1 na bÍlis, com atividade estrogênica total de 10 ± 5 ng de E2eq/mL (média $\pm$ erro padrão) em machos e 31 ± 9 ng de E2eq/mL em fêmeas. Os peixes expostos aos efluentes das ETEs continham concentrações (ng E2eq/mL) consideravelmente alta na bÍlis: E2 (♂, 591 ± 125 ; ♀, 710 ± 207), E1 (♂, 338 ± 75 ; ♀, 469 ± 164), EE2 (♂, 32 ± 2 ; ♀, 40 ± 6) e NP (♂, 21 ± 4 ; ♀, 22 ± 3).

Este estudo mostrou que contaminantes de mistura estrogênica (E1, E2, EE2, NP) presentes em efluentes de ETE, bioconcentrados em tecidos de peixes, resultando na indução

de VTG, são um forte contribuinte para os efeitos de feminização dos peixes que vivem nos rios do Reino Unido. A composição da mistura estrogênica na bÍlis do peixe é dependente da espécie e pode determinar a suscetibilidade do peixe aos efeitos da exposição a efluentes de ETE estrogênicos.

Outros estudos com outras espécies de peixe demonstraram que concentrações de estrógenos são suficientes para causar danos reprodutivos em peixe: Feminização do tubo reprodutivo foi observado em peixes zebra (*Danio rerio*) juvenis expostos a 100ng/L de 17 β -estradiol, por 21 a 42 dias, durante o período de diferenciação sexual (THORPE 2003).

LANGE *et al.*, (2001), estudando os efeitos do 17 α -etinilestradiol em peixes machos da espécie *Pimephales promelas*, observou que 2ng/L eram suficientes para indução de VTG. Os efluentes de ETE contêm um grande número de produtos químicos ainda não identificados e que podem também possuir atividades estrogênicas.

A possibilidade de exposição a contaminantes ambientais que podem causar disfunções endócrinas tem incentivado a pesquisa de novos métodos de análises de substâncias estrogênicas em águas residuárias (JONKERS *et al.* 2001, ALDA *et al.*, 2000, FERRERO *et al.*, 1997, OOSTERKAMP *et al.*, 1997, FERGUSON *et al.*, 2001).

LIND *et al.* (2004), confirmaram que jacarés juvenis (fêmeas) que viveram no lago poluído com pesticida (Apopka, Flórida) apresentaram um aumento da massa óssea, provavelmente devido à exposição aos disruptores endócrinos.

MARISHENG *et a.* (2006) também, recentemente, mostrou que trato reprodutivo de ratas é permanente reprogramado depois da exposição aos PCBs, e as ratas mais sensíveis à exposição desses DE revelaram uma importante pré-disposição genética para riscos dos DE. Entretanto efeitos da exposição humana aos DE ainda são pouco conhecidos devido a complexidade do funcionamento do sistema endócrino.

Este problema de saúde pública e ambiental tem sido motivo de muitos encontros e congressos. Em 2001, um congresso foi realizado na Dinamarca, com a participação de, aproximadamente, 250 cientistas com trabalhos e discussão sobre disruptores endócrinos e seu impacto na saúde humana (SKAKKEBAEK, *et al.* 2001).

Um *Workshop* sobre os interferentes endócrinos fez parte do 3º Congresso Mundial da Associação Internacional de Água realizado em abril de 2002. Conferencistas dos EUA (SNYDER, 2002), Europa (KNACKER, *et al.* 2002), África do Sul (VAN WYK *et al.* 2002), Japão (KOBUE *et al.*, 2002) e Austrália (FURHACKER, *et al.* 2002) apresentaram projetos em nível nacional com ênfase nos interferentes endócrinos, incluindo sistemas de teste, bioensaios, avaliação de risco, monitoramento, remoção em águas e processos de tratamento de esgoto.

Nas últimas duas décadas, houve um aumento da preocupação na comunidade científica, do público e da mídia em relação aos possíveis efeitos danosos causados aos humanos e outros animais pela exposição a substâncias químicas presentes no meio ambiente que têm o potencial de afetar o sistema endócrino.

Para esclarecer, desenvolver estratégias e solucionar o problema dos disruptores endócrinos, várias organizações governamentais e não governamentais, como European Union Européia (UE), United States environmental Protection Agency (USEPA), Organização Mundial de Saúde (OMS), International Program Chemistry Security (IPCS) e a European Organization for Economic Co-operation and Development (OCDE), investigam a questão dos mesmos. Alguns estudos são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Seminários, comitês e relatórios de avaliação sobre os DE no ambiente.

Ano	Organização	Objetivos do Estudo
1995	Agência Ambiental Alemã	Discussão sobre ocorrência e impacto dos DE e riscos potenciais que podem causar aos humanos e outros animais
1995	US EPA	Seminário para avaliar os riscos à saúde e efeitos ambientais dos DE
1995	Ministério do meio Ambiente e Energia Dinamarca	Avaliação dos efeitos de substâncias estrogênicas no desenvolvimento e nas funções do sistema reprodutivo masculino.
1996	US EPA	Seminário para desenvolvimento de estratégia para avaliar o risco dos DE ao meio ambiente.
1996	US EPA	Desenvolvimento de programa de testes e análises (“screening”) para avaliar a ação dos DE.
1997	US EPA	Relatório sobre os DE presentes no meio ambiente.
1998	US EPA	Revisão e discussão das informações científicas disponíveis sobre os DE.
1998	OCDE	Desenvolvimento de métodos de ensaio para os DE.
1999	CSTEE	Revisão da literatura existente e opinião científica nas evidências dos DE, em particular, avaliação dos riscos ecológicos e diretrizes de ensaios toxicológicos.
1999	Comissão das comunidades Européias	Identificação do problema dos DE, suas causas, conseqüências e definição das medidas adequadas para dar resposta ao problema.
2001	Comissão das comunidades Européias	Primeiro relatório sobre o progresso dos trabalhos da comunidade europeia sobre os DE
2002	Comissão das comunidades Européias	Programa COMPREHEND: Avaliação das evidências dos DE no ambiente.
2002	OCDE	Avaliação dos métodos de ensaios para as substâncias estrogênicas.
2002	WHO	Avaliação global do estado da arte da ciência dos DE.
2003	IEH Europa	Relatório de avaliação do progresso internacional da pesquisa dos DE.
2004	Comissão das comunidades européias	Segundo relatório sobre o progresso dos trabalhos sobre os DE.

Fonte: BILA *et al.*, 2007

3.4 ESTUDOS DE REMOÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM ETE

Os DE são compostos que podem ser excretado por humanos e lançados no ambiente via esgoto ou efluente de ETE e podem ter impactos significativos sobre a biota no ambiente aquático e na saúde humana.

Os processos biológicos de tratamento em ETEs, tais como lodos ativados e filtros biológicos, têm mostrado capacidade de reduzir a concentração de certos compostos DE por biodegradação ou adsorção no lodo.

No Brasil, Termes *et al.* (1977), realizaram o monitoramento de estrogênios naturais e do contraceptivo sintético 17 α -etinilestradiol na ETE da Penha/RJ. No esgoto doméstico, os estrogênios 17 β -estradiol e estrona foram detectados em concentrações de 0,021 e 0,04 μ g /L, respectivamente. As taxas de remoção de estrona observadas foram de 67% no filtro biológico e 83% no processo de lodos ativados. Para o 17 β -estradiol, estas taxas foram de 92 e 99,9% respectivamente. Para o estrogênio contraceptivo 17 α -etinilestradiol, as taxas de remoção na ETE foram de 64 e 78% no filtro biológico e no sistema de lodos ativados.

A Tabela 6 apresenta as remoções de estrogênios monitoradas por TERNES *et al.* (1999), na ETE da Penha na cidade Rio de Janeiro.

Tabela 6- Monitoramento de estrogênios na ETE da Penha-Rio de Janeiro E da Penha/RJ.

<i>Substância</i>	<i>Carga estrogênica (g/dia)</i>	<i>Remoção(%)</i>	
		<i>Filtro Biológico</i>	<i>Lodo Ativado</i>
Estrona	5,0	67	83
17β estradiol	2,5	92	99
17α etinilestrdiol	0,6	64	78

Uma avaliação feita por BARONTI *et al* (2000), em seis ETEs ao redor da cidade de Roma sugere uma média de remoção de 61% de E1, 85% de E2 e 95% de EE2 em processos de tratamento de lodos ativados.

ESPERANZA *et al.* (2004) conduziram uma investigação de em escala piloto com tratamento aeróbico e anaeróbico para determinar a remoção de DE. Observou-se completa remoção para testosterona e progesterona. A tabela 7 mostra as remoções dos demais estrógenos investigados.

Tabela 7: Remoção de Disruptores Endócrinos em ETE piloto.

Substância	Tratamento anaeróbico			Tratamento aeróbico		
	Efluente primário ng/L	Efluente final ng/L	Remoção (%)	Efluente primário ng/L	Efluente final ng/L	Remoção (%)
Estriol	17	6	65	5	6	120
Estrona	66	28	58	37	18	52
17β estradiol	62	62	100	30	2	94
17α etinilestradiol	54	13	75	29	15	50
Nonilfenol	14.650	950	94	20.420	1.930	91

Fonte: ESPERANZA *et al.*, 2004

KÖRNER *et al.* (2001) investigaram a remoção da atividade estrogênica do efluente doméstico em uma planta de tratamento na Alemanha. Verificaram que 90% da atividade estrogênica foi removida e somente 2,8% foi encontrada no lodo biológico, concluindo que a maior parte das substâncias responsáveis pela estrogenicidade do esgoto doméstico foi de fato

biodegradada e não adsorvidas nas partículas sólidas ou no lodo biológico. Porém, as taxas de eliminação individuais das substâncias foram diferentes, algumas foram totalmente removidas enquanto que outras foram ainda detectadas no efluente da ETE, tais como, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol. Outros estudos mostram uma variação da taxa de adsorção dessas substâncias no lodo biológico (HOLBROOK *et al* 2004). A adsorção dessas substâncias no lodo biológico é um importante caminho para sua remoção, o que justifica a quantificação do lodo (JOHNSON *et al.* 2001, BILA 2007).

Tecnologias de tratamentos que podem remover eficientemente os DE têm sido bastante investigadas; os processos oxidativos vêm ganhando atenção no tratamento de efluentes industriais e domésticos, bem como no tratamento de água potável. Recentes estudos mostram que os processos oxidativos, tais como e os Processos Oxidativos Avançados (POA), ozonização (O_3/H_2O_2), fotocatálise (H_2O_2/UV) são tecnologias promissoras na remoção desses micropoluentes no tratamento de água potável ou de outros sistemas aquosos. A fotocatálise com TiO_2 tem sido bastante estudada na degradação de estrogênios (17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol) e outros DE alcançando boas remoções (ROSENFELDT *et al*, 2004, BILA, 2007). A ozonização tem sido considerada como uma tecnologia promissora na remoção de estrogênios naturais e sintéticos de efluentes de ETE

Outros tratamentos também foram e tem sido investigado na remoção de disruptores endócrinos em sistemas aquosos, tais como adsorção em carvão ativado, nanofiltração em membranas (NF), osmose reversa (OR), cloração, entre outros (FENDINGER *et al.* 1992, SCHÄFER *et al* 2003, CHANG *et al.* 2003).

O sistema de filtro biológico em conjunto com o óxido de manganês (MnO_2) foi empregado na oxidação de Disruptores Endócrinos. O MnO_2 é um conhecido oxidante e suas reações redox na superfície com compostos orgânicos estão sendo estudadas. Neste sistema biocatalítico, o MnO_2 e as bactérias que oxidam o manganês são integrados. O MnO_2 oxida os micropoluentes em moléculas menores, que junto com o Mn^{2+} são degradados biologicamente e o manganês reoxidado é depositado novamente no MnO_2 . Estudos com esse sistema de tratamento, alcançaram a remoção de 81,7% de atividade (BILA *et al*, 2007).

3.5. PROCESSO DE TRATAMENTO DE ÁGUA EM ETA

O tratamento da água consiste em alterar as características físicas, químicas e biológicas da água, de modo a satisfazer ao padrão de potabilidade que, no Brasil, é estabelecido pela Portaria 518/GM do Ministério da Saúde, de 25 de Março de 2004.

Os processo de tratamento de águas mais comum nas ETAs é do tipo convencional acrescido de pré e pós cloração. As etapas micro peneiramento, aeração, coagulação e floculação, decantação e filtração, desinfecção. Entretanto, outros processos são utilizados como carvão ativado, membranas filtrantes e processos oxidativos.

3.5.1. Carvão ativado

O carvão ativado é um adsorvente que pode ser usado em forma de pó (CAP) ou em forma de grânulos (CAG). O carvão utilizado nas ETA brasileiras, em geral, é de base vegetal. Diz-se ativado porque é submetido a altas temperaturas (200 a 1000 °C), resultando em um material muito poroso (US EPA 2001).

O CAP remove efetivamente muitos poluentes orgânicos problemáticos, como por exemplo: compostos que têm odor e sabor e alguns pesticidas, herbicidas e hormônios. A adição de CAP em plantas de tratamento de água, pode ser efetivo na remoção de mais de setenta e cinco por cento dos DE (WESTERHOFF 2003).

3.5.2. Membranas filtrantes

As membranas filtrantes representam a tecnologia mais avançada para a filtração de água, entretanto gera problemas de rejeitos. Permitem, dependendo do tamanho dos poros da membrana, separar íons de diâmetro pequeno, como o cloreto de sódio (0,1-1 nm, membranas de osmose reversa), macromoléculas e partículas coloidais (1-100 nm, membranas de ultrafiltração) e partículas microscópicas (100 – 10000 nm, microfiltração). As membranas podem ser sintetizadas a partir de precursores orgânicos ou inorgânicos (SOUSA E SOARES, 1999). O mercado de tratamento de água e de esgoto é atualmente dominado por membranas

produzidas a partir de polímeros orgânicos. No Brasil, seu uso ainda restringe-se a plantas industriais devido, principalmente, seu alto custo.

3.5.3. Processos oxidativos avançados

Os recentes desenvolvimentos no âmbito do tratamento químico da água acrescentem melhorias quanto aos procedimentos por oxidação dos compostos orgânicos dissolvidos, aplicando os métodos catalíticos e fotocatalíticos. São métodos que utilizam catalisadores, como, por exemplo, TiO_2 , CdS , ZnO , WO_3 , ZnS , BiO_3 e Fe_2O_3 para acelerar a reação ou, em muitos casos, também a luz. Estes métodos são conhecidos pelo nome de processos oxidativos avançados (POA).

Segundo DING *et al.* (2001), os POA podem ser divididos em dois grupos: oxidação fotocatalítica homogênea (UV/peróxido de hidrogênio e UV/ozônio) e oxidação fotocatalítica heterogênea (UV/semicondutor fotocatalítico). Nesses processos ocorre a reação entre a radical hidroxila e os componentes orgânicos na presença de oxigênio e luz ultravioleta. Vantagem única de sua aplicação é que os elementos orgânicos são completamente mineralizados, sendo o produto final dióxido de carbono, água e alguns ânions, como nitrato, sulfato ou cloreto. Uma grande variedade de compostos orgânicos pode ser tratada pelo método heterogêneo, devido ao alto poder oxidante do radical hidroxila (ERIS, *et al.* 2007). No Brasil, o uso de POA tem ficado restrito ao tratamento de efluentes especiais, notadamente aqueles de poluentes de baixa degradabilidade, em plantas industriais.

3.6. REMOÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM ETA

Muitos dos DEs potenciais estão presentes na água de rios, lagos ou fontes, que são captadas e tratadas em ETA, e podem não ser removidos durante o processo de tratamento e chegar até o homem através da água potável. A ocorrência em nível de traços (n/L ou $\mu\text{g/L}$) é um desafio para detecção, avaliação e remoção destes compostos em água potável (TERMES *et al.* 2002)

A US EPA (2001) realizaram um estudo para avaliar quais processos e operações unitárias usados no tratamento de água poderiam ser empregados para remoção de alguns DE. Concluiu que a melhor tecnologia disponível no tratamento de água para remoção de pesticidas (ex. metoxicloro, endosulfano e DDT), ftalatos (ex. DEHP e DEP), alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados (ex. nonilfenol) e PCB é o processo de adsorção em Carvão Ativado Granular.

Em estudos recentes de remoção de fármacos e produtos de uso pessoal (PPCPs) em ETA piloto, WESTERHOFF *et al.* (2005) concluíram que:

- O tratamento convencional não constitui, por si só, um método efetivo para remoção de DE. A coagulação com sulfato de alumínio ou cloreto férrico removeu menos que 20% dos compostos, os quais foram associados com matéria particulada;
- A adição de 5mg/L de carvão ativado em pó (AC800-Actcarb, Dunnellon, FL) com 4 horas de tempo de contato removeu 76% de E1, 77% de E2 e 84% de E2. Para outros DE, a remoção variou de 10 a 95%;
- A cloração, pela adição de 1 a 6 mg Cl_2/L , após 24 horas, resultou em 1mg Cl_2 de residual por litro. Os compostos contendo anel aromático com um grupo funcional hidroxílico foram os mais reativos, obtendo-se uma remoção de mais de 90%; e compostos sem anel aromático e com grupos carboxílicos foram menos reativos, obtendo-se uma remoção de menos que 20%. A ozonização com 1 a 8 mg O_3/L por 3 a 5 minutos oxida compostos similarmente à cloração. O ozônio, a adição de peróxido de hidrogênio durante a ionização aumenta levemente a remoção do DE e dos PPCPs.
- A radiação ultravioleta (UV) é capaz de oxidar os compostos aromáticos DE, mas requer, aproximadamente, 100 vezes dosagens mais altas de UV (tão grandes quanto 5.000 mJ/cm^2) do que aquelas requeridas para fazer desinfecção (5 a 50 mJ/cm^2). Por isso, o uso da radiação UV é inviável na remoção de DE em água de superfície e em ETA , mas pode ser apropriada para pequenos sistemas de tratamento (WESTERHOFF, *et al.* 2003).

A primeira documentação de estudos feitos para fármacos e DE para verificar a persistência em água após o tratamento em ETA convencional foi feita nos EUA. A investigação foi conduzido por STARCKELBERG *et al.* (2004) através da análise de 106 compostos orgânicos (contaminantes) existentes em ETE. A ETA que provia água potável

para 850.000 pessoas era composta pelas seguintes unidades: grades (peneira) para retirada do material grosseiro, adição de CAP para remover o sabor e odor, adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de cálcio para controlar o pH, desinfecção com hipoclorito de sódio, adição de um sal coagulante e polímeros para desestabilizar as partículas coloidais e facilitar a floculação, agitação da água coagulada para promover a agregação de materiais em suspensão, sedimentação e filtração em areia e carvão ativo granulado (GAC), seguida de uma segunda desinfecção com hipoclorito de sódio e manutenção do cloro residual no sistema de distribuição e por fim adição de soda cáustica para manter o pH na faixa de 7,8 a 8,2 (fig.5).

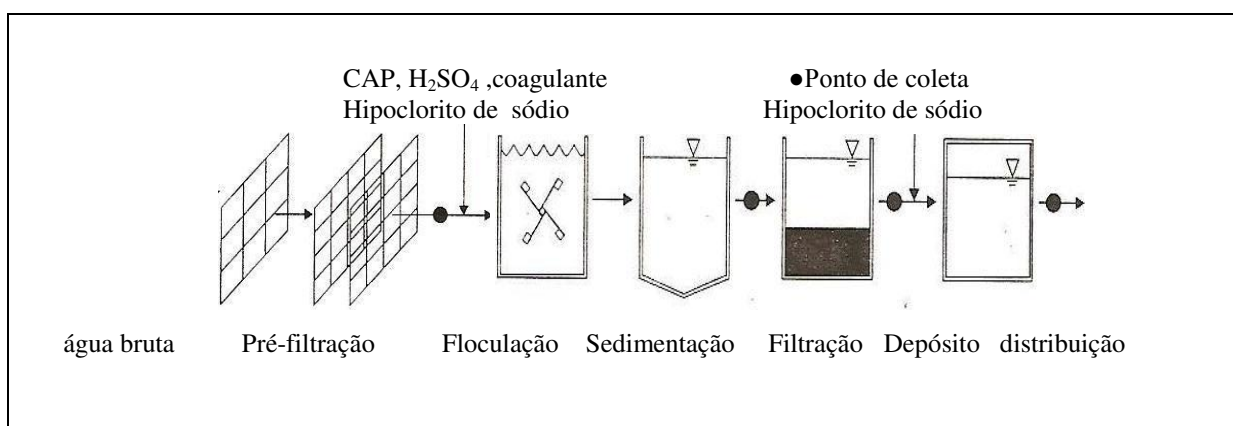


Figura 5: Diagrama dos processos usados na ETA estudada (STARCKELBERG et al. 2004)

Os resultados desses estudos mostraram que 40 compostos analisados foram persistentes na água tratada, ou seja, o tratamento na ETA não foi eficiente para remoção dos mesmos.

A aplicação de processos com membranas de nanofiltração (NF) e osmose reversa (OR) no de tratamento de água aumentou significativamente no exterior. Processos de NF e OR são particularmente efetivos na remoção de micropoluentes inorgânicos (tais como, nitrato, arsênio e flúor) e orgânicos (tais como, pesticidas, estrogênios, entre outros (SCHÄFER *et al.*, 2003, NGHIEM *et al.*, 2004, BILA *et al.*, 2007). Os resultados de estudos de CHANG *et al.*, (2003) mostraram que hormônios, natural e sintético, são acumulados e retidos por membrana de nanofiltração, podendo ser aplicada especialmente em água potável. A oxidação por ozônio, permanganato de potássio e fotocatalise por óxido de titânio degradam DE efetivamente. A ozonização da água do Lago de Zurich degradou 99% de EE2. O permanganato de potássio decompôs a mistura de 2-4diclorofenol, nonilfenol e Bisfenol A em

60 minutos. O processo de fotocatalise por TiO_2 recentemente tem mostrado que degrada alguns DE, como E2, BPA e 2-4 diclorofenol. Os DE (E2, EE2 e BPA) foram mais efetivamente degradados utilizando UV/ H_2O , quando comparado com a fotólise UV (ROSENFELD *et al.* 2004).

Em extensivo estudo feito recentemente por CHOI *et al.* (2006). Que tinha por objetivo avaliar a remoção de NP e BPA através de experimentos em ETA piloto, usando vários tipos de processos de tratamento de água, observou-se que esses DE podem ser removidos eficientemente por oxidação ou por carvão ativado granulado (tabela 8).

Tabela 8. Comparação de remoção NP e BPA em ETA piloto (CHOI *et al.* 2006).

<i>Processos de Tratamento de água</i>	<i>Tempo de contato</i>	<i>Remoção NP</i>	<i>Remoção BPA</i>
Coagulação, sedimentação e filtração		4 a 7%	0 a 3%
Oxidação por ozônio : 1 mg O_3/L	7 minutos	89%	60%
$\geq 4\text{mgO}_3/\text{L}$	7 minutos	100%	100%
Oxidação por cloro: 1 mg Cl_2/L		5%	58%
$\geq 5\text{mg Cl}_2/\text{L}$	7 minutos	100%	100%
Ozonização / Cloração: 4mg $\text{O}_3/\text{L}+5\text{mg Cl}_2/\text{L}$	7 minutos	100%	100%
Adição de CAP: 3 a 10mg/L	15 minutos	40%	25 %
Coluna de CAG	5 minutos	100%	100%

Fonte: CHOI *et al.* 2006

3.7. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM AMOSTRAS AQUOSAS

A presença de disruptores endócrinos em concentrações muito pequenas, na faixa de ng/L e µg/L, requer técnicas analíticas muito avançadas e são um desafio para muitos pesquisadores. Métodos analíticos publicados são frequentemente baseados na extração por fase sólida (EFS), derivatização e detecção por CG/EM, CG/EM/EM ou CLAE/EM/EM. A EFS é uma técnica de extração relativamente simples, e que requer pequenas quantidades de solventes. Geralmente são usados cartuchos ou discos de extração, comercialmente disponíveis, com uma variedade de adsorventes, tais como, C₁₈, resina de copolímero poliestireno (ENV), sílica, alumina B. A EFS não é só uma técnica de extração, mas também de concentração dos componentes.

Nos últimos anos, várias técnicas têm sido desenvolvidas para analisar substâncias estrogênicas naturais e sintéticas em matriz aquosa (mostradas na Tabela 9). A Cromatografia Gasosa ou a Cromatografia Líquida seguida da Espectrometria de Massa são as mais utilizadas e propostas para monitoramento desses estrogênios em água. Tanto uma como a outra têm mostrado boa eficiência de recuperação (80 a 90 %). Entretanto, observa-se que o limite de detecção da cromatografia líquida é menor do que a gasosa. A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de micro análise e, dependendo do detector empregado, pode quantificar massas de componentes inferiores a 10⁻¹⁸g (CIOLA, 2000).

A presença desses micropoluentes em outros tipos de amostras ambientais, tais como, lodo biológico e sedimentos, dita a necessidade do desenvolvimento de técnicas que muitas vezes necessitam de etapas de extração com solvente, purificação (normalmente com sílica gel), cromatografia de permeação em gel e/ou EFS dos componentes antes de serem analisados em técnicas cromatográficas como CG/EM, CG/EM-EM ou CLAE/EM (JOHNSON *et al.* 2000, MOL *et al.* 2000)

Tabela 9: Relação de metodologias analíticas para identificar e quantificar estrogênios naturais e sintéticos

Autor	Extração	Limpeza	Técnica Analítica	Recuperação. (%)	L.D. (ng/l)
Desbrow (1998)	C18	Met./H ₂ O	CG-EM-EM	79 – 85 %	0,2
Termes (1999)	C18	Coluna de Sílica Gel	CG-EM-EM	74 – 86 %	2 – 0,5
Belfroid (1999)	SBD-XC pol. divinil benzeno	C18/NH ₂	CG-EM-EM	88 – 98 %	0.1 – 0.6
Kelly(2000)	C18		CG-EM-EM		20 a 25
Mol (2000)	SPE-C18		CG-EM		50 a 300
Xiao-Yao (2001)	SOB-XC	Met/ acet. Met./água	CG-NCI-EM	84 – 116 %	0,2
Laganà (2000)	SPE-Carbono		LC-MS-MS	84 – 95 %	1,0
Alda (2000)	C18	Metanol Acetonitrila	LC-DAD-MS	89 - 96 %	50
M. Serrat (2000)	C18	Acetonitrila	LC-DAD-MS		50
Johnson (2000)	SPE-Carbono grafite	Água/met. Ác. Fórmico	CLAE-EM-EM	89 – 97 %	0,2 a 0,25
Baronti (2001)	SPE-Carbono grafite	Água/meanol. Ác. Fórmico	CLA-EI-EM-EM	89 – 90 %	0,008 a 0,03
Kuch (2001)	C18		CG-EM	67 – 79 %	0,02 a 0,05
Beck(2005)	SPE	Acetona/ metanol	CLA-EI-EMEM	75-91%	0.02 a 1.0

A literatura (BILA, *et al* 2007, FERRERO *et al.* 1997, TYLER *et al.*1999) também relata o uso de técnicas biológicas na identificação e quantificação de estrogênios naturais e sintéticos, tais como ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) e radioimunoensaio (RIA). O ensaio ELISA, que é baseado no uso de antígenos, tem sido descrito como um método altamente sensível e seletivo para análise de estrogênio e outros disruptores endócrinos em ambientes aquáticos. O ensaio ELISA é usado em conjunto com técnicas de extração, como EFS, para aumentar seu limite de detecção. Recentemente, estão sendo desenvolvidos outros métodos analíticos baseados em imunoenaios para monitorar estrogênios e pesticidas em amostras de água, tal como um bio-sensor óptico.

Extração em fase sólida (EFS) seguida da determinação cromatográfica gasosa acoplada à espectrometria de massa CG/ES ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM-EM) é método muito utilizado devido sua sensibilidade e seletividade. O detector EM/EM, é mais seletivo: produzindo um sinal com menor ruído.

3.7.1 Extração em Fase Sólida (EFS)

Hoje em dia a extração em fase sólida é um dos instrumentos mais poderosos e mais empregados para extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas, permitindo que concentrações muito baixas sejam detectadas. Esta técnica é mais avançada quando comparada com a extração líquido-líquido, principalmente com relação a redução da quantidade de solvente da amostra envolvida em cada extração, e envolve menor risco de erros operacionais. Além disso, muitos analitos polares, tais como, produtos de degradação de micropoluentes orgânicos não podem ser extraídos. Uma consequência disso é que EFS tem sido utilizada cada vez mais, inclusive em métodos oficiais, como os recomendados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos . A extração em fase sólida é usualmente empregada com o propósito de isolar um ou mais analitos (substâncias desejadas) presentes em matriz complexa. O formato mais popular em

EFS é o cartucho (figura 6). Uma seringa plástica (usualmente de polipropileno) é empregada, dentro da qual o material de empacotamento (sorbente) fica retido entre dois filtros de polietileno; a parte inferior do cartucho é afunilada e apresenta uma extensão que se encaixa em um dispositivo para efetuar vácuo.

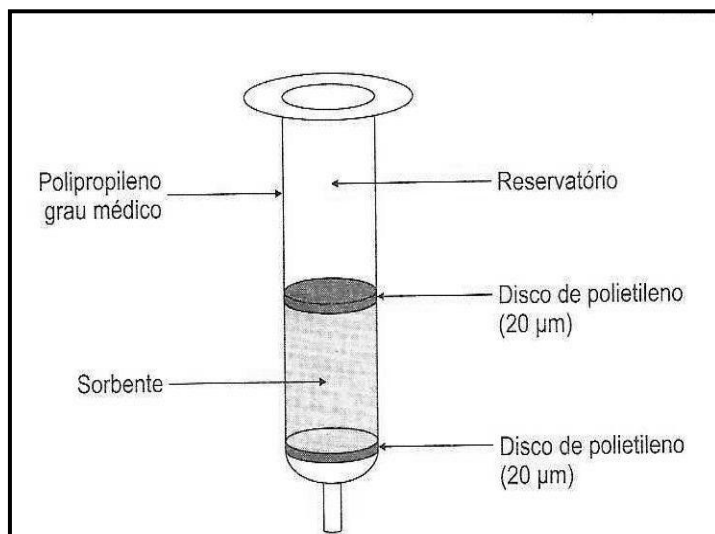


Figura 6. Cartucho típico empregado em EFS (LANÇAS, 2004).

Além do formato cartucho, há vários outros para EFS, incluindo discos, fibras e placas, mostrados na figura.

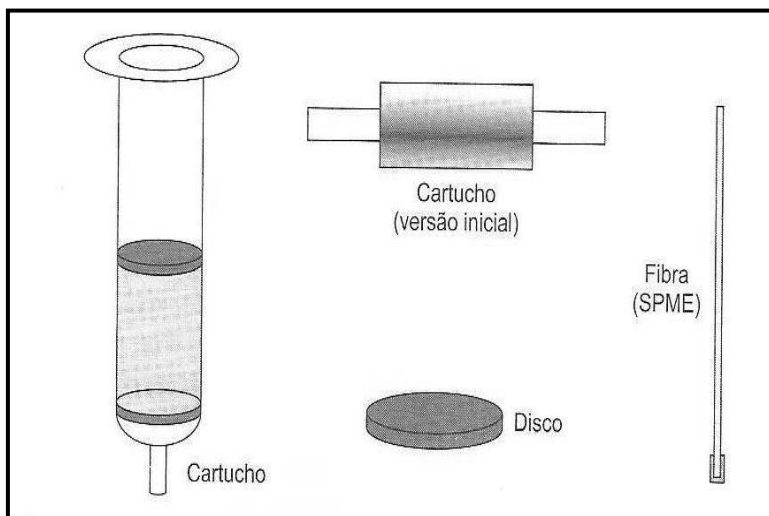


Figura 7: Formatos empregados em EFS (LANÇAS, 2004)

Os materiais utilizados como sorbente em EFS são similares àqueles empregados em cromatografia líquida. Assim, materiais tais como sílica gel, alumina, silicato de magnésio (florisil), carvão ativado, polímeros e fases baseadas em sílica quimicamente ligada como C₁₈, por exemplo, (LANÇAS, 2004 e CIOLA, 2000) são amplamente empregadas. A escolha da fase sólida apropriada depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra.

Atualmente, a EFS é amplamente empregada em todo mundo, sendo utilizada principalmente na preparação de amostras para análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa. A maioria das aplicações utilizando EFS está na determinação de traços de contaminantes orgânicos em água, análise de efluentes, amostragem de poluentes em águas residuárias (BARONTI *et al.* 2001, MOL *et al.* 2000). A ampla gama de aplicações da EFS é possível devido à diversidade e versatilidade dos materiais contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e diversos mecanismos de separação. Como limitações para a EFS podem ser citados o alto custo de dispositivos comerciais (*manifolds*), o custo dos dispositivos de extração (cartucho, disco), a impossibilidade de reaproveitamento dos cartuchos quando aplicados a matrizes complexas.

Em geral, os procedimentos para SFS envolvem de 3 a 4 etapas:

1-Ativação do sorvente (fase sólida do cartucho) para deixar os sítios ativos disponíveis e condicionamento do cartucho com solvente adequado (o mesmo que será utilizado para fazer eluição), para ajustar as forças do solvente de eluição com o sorvente;

2-Introdução da amostra, em que ocorre a retenção do analito e, às vezes, de alguns interferentes;

3-Limpeza do cartucho (lavagem com outro solvente), para retirar os interferentes menos retidos que o analito (quando necessário);

4- Eluição e coleta do analito. A figura 8 mostra esta sequência de extração.

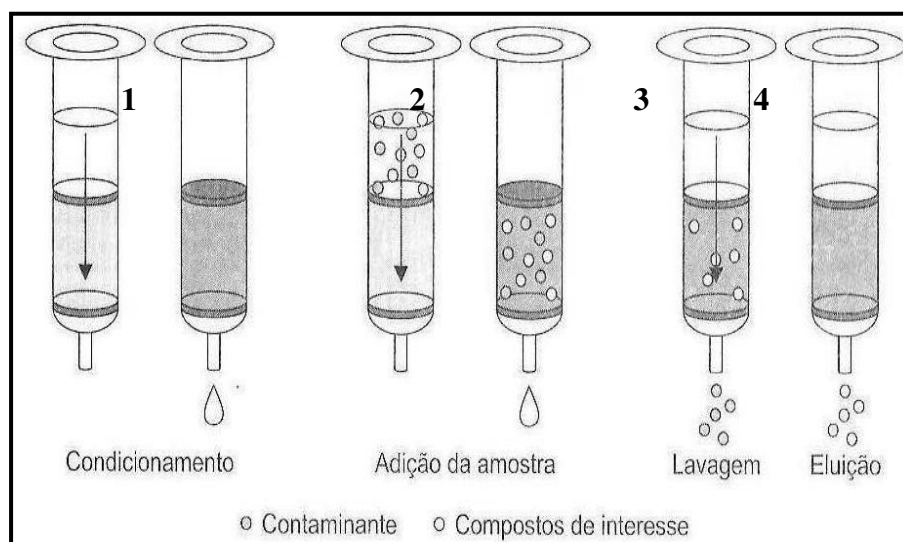


Figura 8: Esquema das etapas do procedimento da extração em fase sólida (LANÇAS 2004).

3.7.1.1. Modo de Operação da Extração em Fase Sólida

Os principais modos de operação em EFS segundo Lanças (2004) são: Concentração de analitos, isolamento de analitos, isolamento de matriz e estocagem de amostra.

Concentração dos Analitos (enriquecimento)

O objetivo principal é passar, através do cartucho, um grande volume de amostra a fim de aprisionar somente o analito, deixando passar o solvente e os interferentes. Em etapa seguinte, elui-se o analito de interesse com pequena quantidade de solvente, de forma que o analito coletado esteja bem mais concentrado que na amostra original. Este tipo de procedimento é muito comum na análise de amostras de interesse em química ambiental, nas quais, usualmente, o analito encontra-se extremamente diluído (micropoluentes em água potável). Após a etapa de concentração, a amostra estará em um nível de concentração apropriado para ser analisada diretamente por uma técnica analítica adequada.

Isolamento do analito (*Clean-up*)

Neste caso, o objetivo principal não é o de concentrar a amostra, mas, sim, isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. A amostra original pode já ser concentrada o

suficiente para análise por uma técnica apropriada, mas os constituintes da matriz poderão interferir no processo de análise. Um exemplo típico de aplicação do *clean-up* é na análise e resíduos de agrotóxicos em alimentos ou em água. Como se trata de uma matriz muito complexa, com centenas de compostos químicos presentes, é necessário isolar o pesticida dos outros componentes presentes no extrato, antes da medida analítica. A concentração dos analitos ou o *clean-up* da amostra pode ser efetuado em um mesmo procedimento.

Isolamento da matriz.

Neste procedimento o objetivo é reter na fase sólida os interferentes da matriz, em vez de o analito de interesse (o qual passa direto com o solvente da amostra). O analito é coletado em frasco pra análise e os interferentes são retidos no cartucho, no qual é eliminado.

Estocagem de amostra

Este procedimento é bastante empregado para análise de amostras que se encontram em local distante do laboratório analítico. Um exemplo típico é a análise de água de rio, lago e mar localizados a grandes distâncias do laboratório em que se desenvolve o estudo. Neste caso, os cartuchos são transportados até a fonte de água e procede-se à primeira etapa da análise no local, que consiste em passar a água através do cartucho, de forma a reter os analitos de interesse. Após essa etapa, o cartucho contendo o analito de interesse é armazenado em baixa temperatura e transportado até o laboratório de análise. É importante realizar estudo preliminar para conhecer a estabilidade do analito de interesse no cartucho a ser empregado (tempo de estocagem, temperatura, natureza do cartucho, etc.)

3.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais nova e mais importante técnica de separação de componentes de uma mistura. A CLAE utiliza instrumentos muito

sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS *et al.*, 1997). O detector é o olho do sistema cromatográfico, que mede as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que está deixando a coluna.

3.7.2.1 Espectrômetro de Massa (EM)

A espectrometria de massa é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial de fornecer informações de massa molar, bem como estrutura do analito. A base da espectrometria de massas é a produção de íons, que são subsequentemente separados ou filtrados, de acordo com sua razão massa/carga (m/z) e detectados. O resultado é um gráfico de abundância relativa dos íons produzidos em função da massa/carga (m/z).

O espectrômetro de massa é um instrumento sofisticado e é constituído basicamente das seguintes partes/etapas: introdução da amostra, fonte de ionização, muitas vezes denominada interface, analisador de massas (ou filtro de massas), detecção de íons e aquisição de dados através de processamento de dados (QUEIRÓZ, 2001), como esquematizado na figura 9.

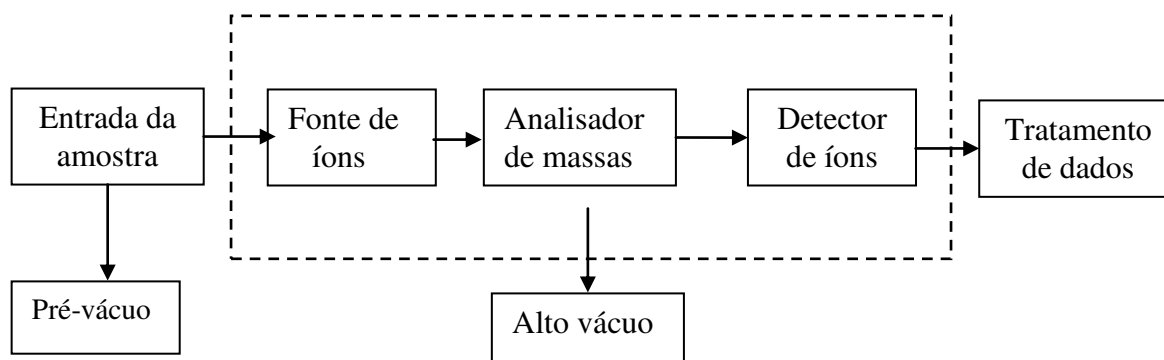


Figura 9 - Diagrama do princípio de operação de um espectrômetro de massa

A amostra injetada no EM é ionizada pela fonte de íons. A ionização do analito pode ser realizada de várias maneiras, sendo que os principais métodos são impacto de elétrons (EI) e ionização química (CI). Os íons formados são analisados de acordo com sua razão massa/carga pelo analisador de massas. Os mais comuns são: quadrupolo (triplo quadrupolo), setor magnético “*ion trape*”, (quadrupolo “*ion trape*”), “*time of flight*” (quadrupolo TOF).

O analisador quadrupolo trata-se de 2 pólos positivos e de 2 pólos negativos posicionados simetricamente e flutuantes na frequência de rádio (RF ~ 1,2 MHz). Os íons que forem acelerados dentro deste campo elétrico mover-se-ão de forma helicoidal e somente sairão deste setor as massas que forem moduladas pela RF.

A detecção de íons é feita por meio de um tubo multiplicador de elétron, que determina a intensidade do feixe de elétrons. Uma enorme quantidade de dados é gerada pelo EM e programas computacionais altamente avançados são necessários para aquisição e processamento de dados (QUEIROZ 2001).

3.7.2.2 Espectrometria de Massa em CLAE-EM/EM

O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com espectrometria de massa (EM) tem sido estudada há 25 anos e as vantagens iniciais que incentivaram o desenvolvimento desta técnica multidimensional são (NIESSEN 1999):

- a-O espectrômetro de massa é um detector universal para CL;
- b-Potencial para análise de compostos não voláteis;
- c-Potencial para análise de compostos termolábeis;
- d-Evita a necessidade de derivatização do analito;
- e-Baixos limites de detecção;
- f-Identificação não ambíguas dos analitos;
- g-Avaliação de pureza de picos.

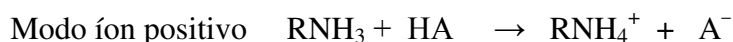
A ionização de elétron (EI) e a ionização química (CI) requerem que a amostra esteja no estado gasoso, ao passo que CL e CL/EM são especialmente interessantes para analitos não voláteis. Isto introduziu técnicas suaves de ionização com “*Fast-Atom Bombardment*” (FAB), “*Thermospray*” e “*Electrospray*” e mais recentemente o “*Matrix-Assisted Laser Desorption*” (MALDI). Como resultado, a ionização dos analitos não é considerada mais um problema. Para resolver a incompatibilidade da vazão, uma variedade de soluções técnicas foi desenvolvida: as interfaces da CL/EM. A interface é um dispositivo colocado entre a CL e EM e serve para remover o solvente e transferir a amostra para fonte de íons. As principais interfaces utilizadas para análise de substância polares são: “*Thermospray*” (TS); “*Particle Bean*” (PB); Ionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization- API*): “*Electrospray*” (ES), Ionização Química à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemistry Ionization- APCI*), e “*Ionspray*” (IS) (NIESSEN 1999).

As interfaces baseadas na ionização à pressão atmosférica, ionização química à pressão atmosférica (APCI) e “*electrospray*”(ES) , são as mais utilizadas no acoplamento CL/EM, devido uma série de vantagens, tais como facilidade de operação, baixo limite de detecção, confiabilidade, robustez e ampla faixa de aplicações. A interface ES é a mais usada atualmente para introdução de líquido no cromatógrafo de massa. É uma técnica simples e elegante, que opera à pressão atmosférica e à temperatura moderada. Provavelmente, é a técnica de ionização mais suave para CL/EM. Além, disso possui limite de detecção, em geral, melhor que as demais técnicas e em geral de fácil operação e manutenção (QUEIROZ).

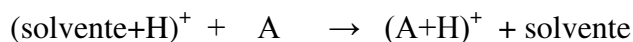
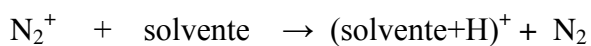
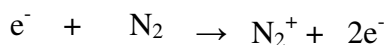
O processo “*electrospray*”(ES) pode ser dividido em três passos: nebulização da solução da amostra em gotas altamente carregadas, liberação dos íons das gotas, transporte dos íons da região da pressão atmosférica para a região de alto vácuo do analisador de massas EM. A nebulização do líquido ocorre devido à aplicação de um campo elétrico alto resultante da diferença de potencial, normalmente de 3-6 kV, entre um capilar e um contra-eletrodo. O mecanismo de ação tem sido bastante debatido, e o mais aceito é que a ionização resulta da evaporação das moléculas neutras do solvente acompanhado pelo aumento da força do campo elétrico na superfície da gota. a instabilidade induzida pelo campo, conduz à formação de um jato de líquido, na superfície da gota, de onde são emitidas pequenas microgotas também

carregadas (explosões coulômbicas). Este processo de evaporação na superfície das gotas continua até certo campo elétrico crítico, quando se acredita que começa a emissão direta de íons dessolvatados das micro gotas. A evaporação é estimulada pelo uso de um gás contra corrente (aquecido) ou por aquecimento capilar.

Na prática, o mecanismo de ionização “*electrospray*” dos analitos é mais complexo ainda, pois além da evaporação dos íons pré- formados nas microgotas, também ocorrem reações na fase gasosa e este fenômeno tem um importante papel no processo de ionização (QUEIROZ 2001) Na interface “*electrospray*” deve-se utilizar tampões com pH alto para íons negativos e pH baixo para íons positivos (dependendo do pKa do analito):



O APCI é uma técnica complementar a ES para analitos menos polares e pode ser utilizada a fase normal. Entretanto, é menos adequada para compostos termicamente instáveis e não tolera altas quantidades de acetonitrila e tampões com alta força iônica. Nesta interface, o efluente da coluna é pneumáticamente nebulizado em tubo aquecido (aço inoxidável ou quartzo), onde a evaporação do solvente é quase completa. O efluente nebulizado através do tubo aquecido é arrastado por fluxo adicional de gás (N_2). A mistura aquecida de solvente e de vapor é então introduzida na API. A ionização química a pressão atmosférica é iniciada por elétrons de uma agulha (corona de descarga) e íons reagentes para a ionização dos analitos gerados:



A formação do íon positivo pode ser obtida por transferência de próton (doação) ou reação de troca de carga, enquanto no modo íon-negativo, pode ser obtida devido à abstração de próton, anexação de ânions ou reação de captura de elétrons. Subseqüentemente, os íons são enviados em direção ao alto vácuo do EM para a análise (QUEIROZ, 2001).

A figura 10 mostra o esquema de um espectrômetro de massa triploquadupolo. Na fonte de íons ocorre a ionização do composto e eliminação dos contaminantes (mesmo em amostras com grande carga de contaminantes). Em seguida, os íons são colimados e dessolvatados em uma célula de alta pressão (Q_0) e transportados para os analisadores (Q_1 , Q_2 , Q_3).

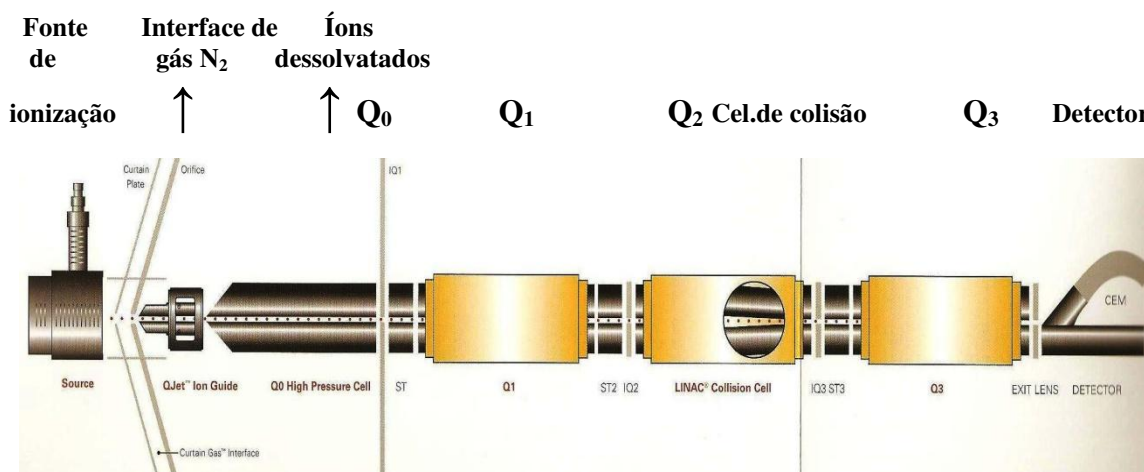


Figura 10: Esquema do sistema de espectrometria de massa triploquadupolo API 5000.

A técnica de CLAE-EM/EM vem se destacando devido à sua alta especificidade analítica quando utilizada em modo “Multiple Reaction Monitoring” (MRM), no qual os analisadores de massas Q_1 e Q_3 , selecionam os íons precursor e produto, respectivamente, definindo uma transição de m/z específica. Neste modo, o segundo quadrupolo (Q_2) funciona como uma cela de colisão, onde os íons precursores selecionados de acordo com as razões m/z em Q_1 , são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), após colisões com um gás inerte sob uma energia específica. Otimizando o detector para tal experimento (MRM), contendo mais de uma transição para o mesmo íon precursor, gera-se um método confirmatório. Assim sendo, o emprego desta técnica fornece informações referentes à retenção do composto na coluna, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade. (JÚNIOR *et al.*, 2006).

3.7.3. Validação de Metodologia

É impossível realizar uma análise química de forma em que os resultados estejam totalmente isentos de erros e incertezas. Assim, é necessário minimizar estes erros e estimar sua grandeza com exatidão aceitável. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). Assim, quando se desenvolve uma metodologia cromatográfica, devem ser realizados testes para verificar a sua confiabilidade, exatidão e precisão, de forma a confirmar sua adequação ao uso pretendido.

Os principais parâmetros de validação são: **seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação e robustez**. A otimização dos parâmetros preparação da amostra e das condições cromatográficas é essencial para obtenção de bons cromatogramas, com uma linha de base ausente de ruídos (o que significa ausência de interferentes) e com uma boa separação de picos. Essas características são expressas pela **seletividade** ou **especificidade**.

A **seletividade** pode ser obtida através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodo, espectrômetro de massa) que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (RIBANI *et al.*, 2004). A seletividade também pode ser obtida pela comparação entre uma análise em branco da matriz e a matriz fortificada, sendo que nesse caso nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção dos analitos de interesse (MELO 2003).

A **linearidade** é a faixa ou intervalo de concentração no qual o sinal produzido pelo detector é diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, é proporcional à concentração dos analitos na amostra (MELO, 2003). Em outras palavras, a linearidade é a medida de quanto uma curva, obtida para respostas versus concentração, se aproxima de uma linha reta, ou seja, quão bem os dados se ajustam à equação linear:

$$y = ax + b$$

Onde y é a resposta cromatográfica em termos de área do pico ou altura do pico, se ele for simétrico, “ x ” é a concentração e “ a ” é o coeficiente angular (inclinação), e “ b ” o coeficiente linear (intersecção).

O coeficiente angular da curva (a) representa a **sensibilidade** do método. Quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração e maior será a sensibilidade do método.

A **exatidão** e a **precisão** determinam, respectivamente, o erro e o desvio da análise e são critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico. A precisão reflete a variação dos resultados quando repetidas análises são feitas em uma mesma amostra, em idênticas condições de teste. O valor numérico usado é o coeficiente de variação (CV).

$$CV(\%) = s/X \cdot 100$$

Em que s = estimativa do desvio padrão absoluto e X = média das medidas em replicata.

De acordo com a ICH (“International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use”) a precisão deve ser medida em três diferentes níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade corresponde ao resultado obtido através de várias reproduções de um método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo (precisão intra-ensaio). A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas, equipamentos, etc. A reprodutibilidade se refere aos resultados de colaboração entre laboratórios (RIBANI *et al.* 2004).

A **exatidão** representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão também pode ser expressa com porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionadas ou fortificadas na matriz limpa da amostra (branco). Portanto, recuperação é a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada no processo de fortificação e ela é expressa como porcentagem:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração medida do analito}}{\text{concentração inicial do analito}} \times 100$$

O **limite de quantificação** é a menor concentração do soluto que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais e geralmente é expresso em unidades de concentração.

O **limite de detecção** representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

A **robustez** refere-se à confiabilidade de uma análise com relação às variações nos parâmetros do método. A robustez de um método analítico é o nível de reprodutibilidade dos resultados dos testes obtidos pelas análises de algumas amostras sob uma variedade de condições normais de teste, tais como diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes de reagentes, diferentes dias, etc” (US Pharmacopeia Convention, 1999). Algumas variações típicas são tempo de extração, pH e/ ou composição da fase móvel, diferentes colunas, temperatura e vazão.

3.8.Estrutura e propriedades físico-químicas dos DE avaliados neste trabalho

Os estrógenos naturais (E1, E2, e E3), sintético (EE2) e xenoestrogênio p-nonilfenol são composto orgânicos hidrofóbicos ambíguos, cujo destino é importante no ambiente aquático (YAMAMOTO *et al*, 2003) .

Os disruptores endócrinos 17 β estradiol (E2), 17 α etinilestradiol (EE2), estrona (E1), estriol (E3) e nonilfenol (NP) têm baixa solubilidade em água (0,8 a 13 mg/L), são

moderadamente hidrofóbicos (log K_{ow} 2,6 a 4,0), ácidos fracos (pK_a 10,05 a 10,23) como mostra a tabela 10 e não são voláteis.

Tabela 10: Propriedades físico-químicas dos DE avaliados

NOME	E2	EE2	E1	E3	NP
Fórmula molecular	$C_{18}H_{24}O_2$	$C_{20}H_{24}O_2$	$C_{18}H_{22}O_2$	$C_{18}H_{24}O_3$	$C_{15}H_{24}O$
Peso molecular	272,4	296,41	270,37	288,4	220,15
Solubilidade em água	3,85 mg/L	19,1 mg/L	30mg/L	30,2mg/L	1,66 mg/L
pK_a	10,23	10,21	10,4	10,05	10,55
Log K_{ow}	4,0	3,67	1.88	2,45	5,76

Fonte: YAMAMOTO *et al*, 2003 e SCHAFER *et al*. 2003

Os estrógenos 17β estradiol (E2), estrona (E1), estriol (E3) e 17α etinilestradiol (EE2) possuem fórmula estrutural semelhante: são moléculas tetracíclicas contendo um anel aromático ligado ao OH (grupo fenólico). A diferença entre eles está nos grupos que estão ligados ao menor ciclo (ciclopentano), como mostra a figura 11.

O estrona difere do estradiol porque tem um grupo carboxílico (C=O) ligado no ciclopentano (cadeia ciclo com cinco carbonos) ao invés de um grupo hidroxílico.

O estriol tem dois grupos hidroxílicos ligados ao ciclopentano, enquanto que o 17α etinilestradiol tem um grupo etinil e um grupo hidroxílico ligados ao ciclopentano.

O 4-nonilfenol apresenta o o grupo fenólico fígado a uma cadeia aberta de nove carbonos, como mostra a figura 11.

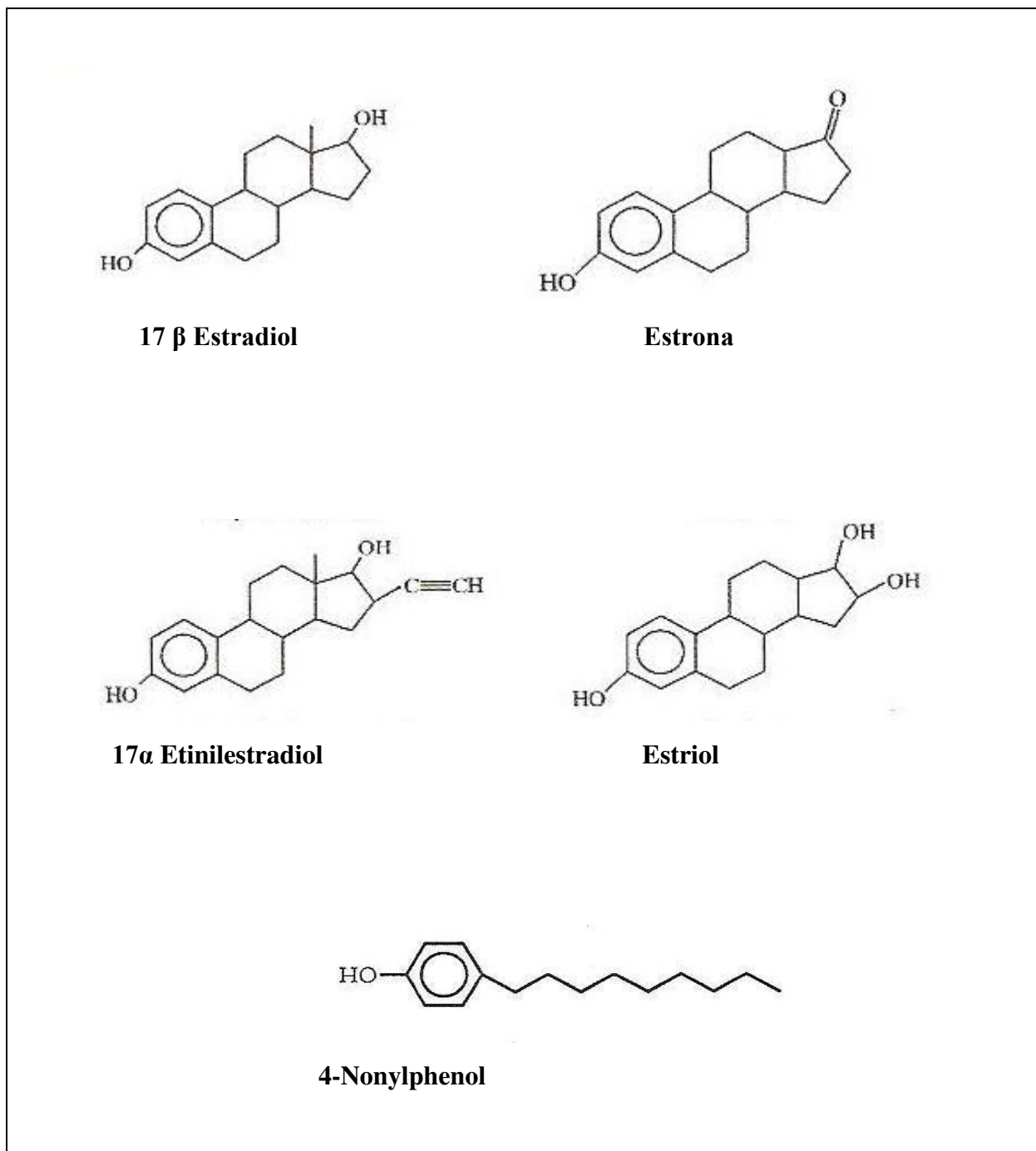


Figura 11: Estruturas dos DE estudados neste trabalho (BILA 2007. MOL *et al.*, 2000)

“Sejam fortes não temam!

Seu Deus virá para salvá-los...

**Então, água irromperão no ermo e riachos no
deserto, a areia abrasadora se tornará em lago
a terra seca em fontes borbulhantes”.**

Isaías 35: 4,6,7.

4. Material e método

4.1. Local de estudo

O estudo foi desenvolvido em sistemas que utilizam o Rio Atibaia como manancial, mais precisamente nas ETA 3 e 4 de Campinas e na ETA 2, de Sumaré, sendo os pontos de coleta melhor descritos a seguir.

4.2. Descrição Geral da Bacia do Rio Atibaia

O Rio Atibaia, de onde a SANASA-Campinas retira a água para ser tratada nas ETAs 3 e 4, está inserido na Bacia do Rio Piracicaba e é considerado um dos mais importantes mananciais com vistas ao abastecimento público da região. A Bacia do Rio Piracicaba possui área de drenagem igual a 11.400 km². Quanto a usos do solo, as pastagens cobrem 57% da área da bacia (40% cultivadas) para rebanho de corte e leite; o uso para agricultura também é significativo, predominando o cultivo de cana-de-açúcar e café, seguidos pela fruticultura (cítricos) e milho, além de hortifruticultura; existem nesta bacia também áreas urbanas densamente ocupadas, abrigando importante parque fabril do Estado de São Paulo. A Bacia do Rio Piracicaba abrange a área declarada, por decreto estadual, como Área de Proteção Ambiental de Piracicaba. Os usos da água incluem: abastecimento público e industrial; afastamento de efluentes domésticos e industriais e irrigação de plantações. Entre as principais atividades industriais da região estão: papel e celulose, alimentícias e sucro-alcooleiro, têxtil, curtumes, metalúrgicas, químicas e refinarias de petróleo (SANASA 2007, CETESB 2007).

Quanto às fontes de poluição, o Rio Atibaia recebe ao longo de seu percurso esgoto doméstico de 10 municípios e efluentes industriais. Em consequência destas descargas, apresenta-se continuamente em desconformidade para os parâmetros coliformes fecais e fósforo total, bem como para os seguintes metais: cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco (CBH – PCJ, 2006)

4.3. ETA 3 e 4 de Campinas

O município de Campinas possui área territorial de, aproximadamente, 796 km², ocupada por uma população urbana de 1.027.273 habitantes, tendo sistema público de abastecimento de água atendendo cerca de 98% da mesma.(SANASA 2007). O mesmo possui uma vazão outorgada de 5,100 m³/s, da qual capta atualmente uma vazão efetiva de 3,42 m³/s, que é usada, para o abastecimento público e privado. Campinas utiliza como mananciais o Rio Atibaia (95% da vazão total) e o Rio Capivari e dispõe de cinco estações de tratamento de água: ETA 1 e ETA 2 (no bairro do Swift), ETA 3 e ETA 4 (em Sousas) e ETA 5 (no rioCapivari), que juntas tratam até 4.530 L/s. Sendo que a ETA 3 e 4 são as duas maiores estações de tratamento de água, responsável por grande parte do abastecimento deste município, como mostra a figura 12.

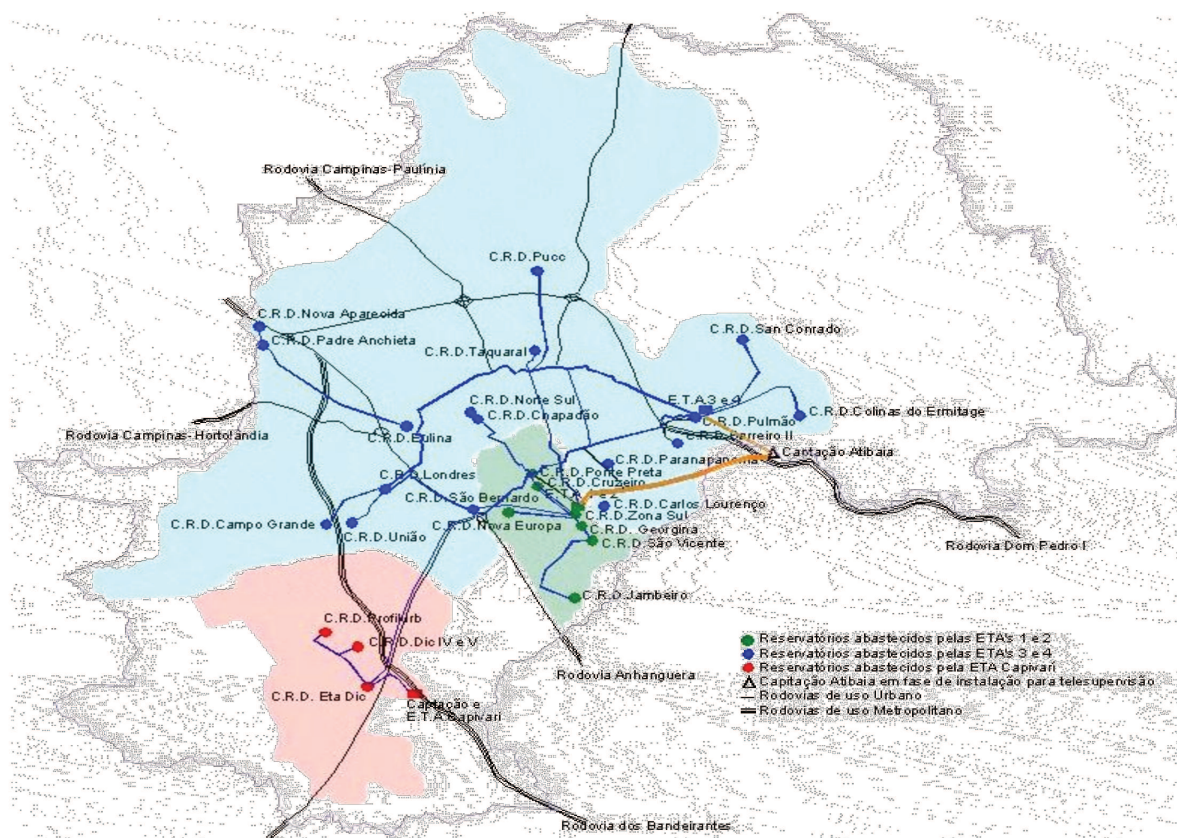


Figura 12: Mapa do sistema de produção e distribuição de água de Campinas. (SANASA 2007)

A sociedade de abastecimento de água e Saneamento (SANASA), é o órgão responsável pelo abastecimento de água de Campinas. A figura 13 mostra a foto aérea da ETA e 3 e 4 que é um dos pontos de coletas.



Figura 13: fotografia aérea da ETA 3 e 4 em Sousas (SANASA)

No ponto de captação (Figura 14), a água bruta passa por gradeamento e caixas de areia, em que ficam retidos os materiais grosseiros, sendo em seguida recalçada por meio de bombas para a entrada das ETAs.



Figura 14: Fotografia aérea do ponto de captação das ETAs 3 e 4

Ambas estações compartilham um sistema único de pré-tratamento, no qual se faz a pré-cloração e adição de carvão ativado em pó à água bruta (quando é necessário). O carvão tem a finalidade de remover as substâncias orgânicas causadoras de cor, sabor e odor e, eventualmente, algas. Este produto é, então, parcialmente removido em pré-sedimentadores, à montante da unidade de mistura rápida. O Sulfato férrico ou policloreto de alumínio (PAC) são utilizados utilizados como coagulante.

O valor do pH de floculação é 7 quando se utiliza o PAC e 6,3 quando o coagulante é o Sulfato férrico. Nesta faixa de valores, a precipitação de ferro e manganês fica facilitada. Uma grande parcela do manganês é proveniente, como impureza, do próprio coagulante. A coagulação ocorre predominantemente no mecanismo de varredura.

Os decantadores na ETA 3 são do tipo convencional (duas unidades) com raspadores contínuos de lodo e os da ETA 4 são do tipo laminar, com placas planas paralelas (duas unidades). Nestes, a remoção do lodo ocorre pela descarga automática. As unidades de decantação antecedem os dezesseis filtros rápidos por gravidade. O meio filtrante é composto por antracito e areia. Os filtros operam por taxa declinante, seu sistema de lavagem é com ar e água em sentido contra corrente. A água de lavagem de filtros é recirculada, após equalização, para o início do tratamento.

A água clarificada, dos decantadores, recebe aplicação de CaO, antes das unidades de filtração. Após a filtração, ocorre a aplicação de amônia para formação de cloraminas e a adição de flúor ($\text{H}_2 \text{SiF}_6$). A água tratada vai para um reservatório para ser distribuída. A figura 15 mostra o diagrama do processo de tratamento de água na ETA 3 e 4 de Campinas.

As coletas das amostras da água bruta foram feitas em ponto anterior ao ponto de cloração e as coletas da água tratada foram feitas na saída da câmara de contato.

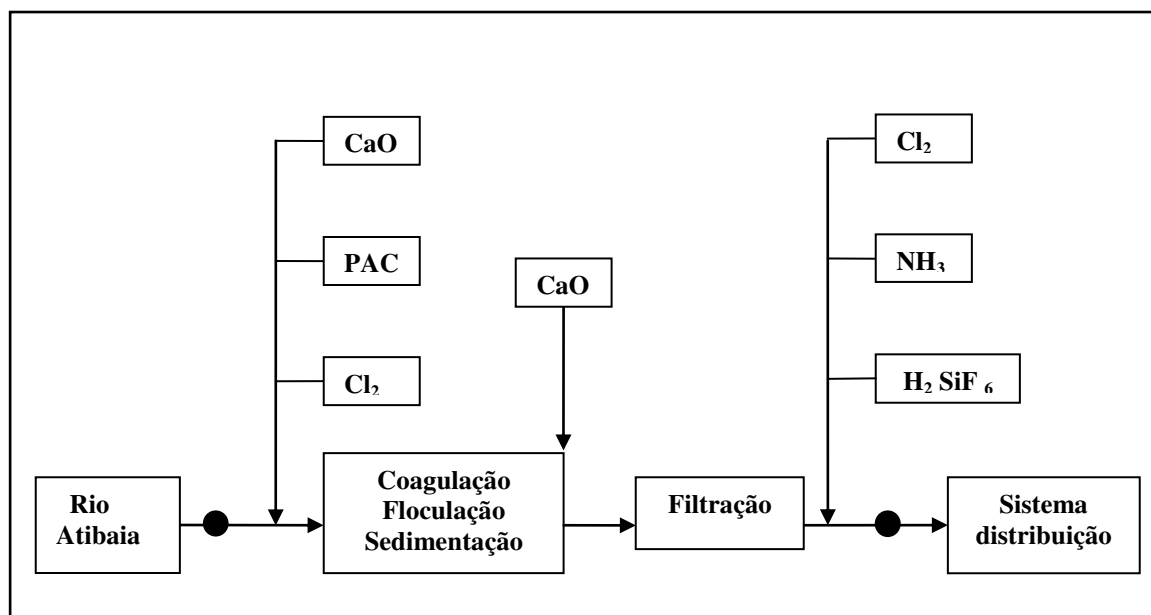


Figura 15: Diagrama do processo de tratamento da ETA 3 e ETA 4 - SANASA.

● indica o local onde as amostras foram coletadas.

4.4. ETA II - SUMARÉ

O município de Sumaré possui área territorial de, aproximadamente, 153 km², ocupada por uma população urbana de 222.230 habitantes, sendo que 98% da mesma são atendidos por sistema público de abastecimento de água (DAE 2007).

Não foi obtida a informação quanto à vazão outorgada para o município de Sumaré, mas o mesmo capta diariamente uma vazão efetiva de 0,767 m³/s, sendo este volume ofertado para abastecimento com uma vazão de 0,713 m³/s, frente a uma demanda de 0,713 m³/s, que é usado para o abastecimento público e privado. São três as captações de Sumaré: ETA 1 capta no Horto Florestal e Represa do Marcelo (Vila Miranda), ETA 2 no Rio Atibaia e poços.

A ETA 2 de Sumaré constitui o segundo local de estudo e está localizada à rua Lindauro Parmegiani s/nº - Parque Itália – Nova Veneza. O órgão responsável pelo tratamento é o Departamento de Água e Esgoto (DAE) do município de Sumaré. A ETA foi inaugurada

no dia 16 de junho de 1992, e capta do rio Atibaia, em Paulínia. O DAE trata $963 \text{ m}^3/\text{h}$, sendo que $755 \text{ m}^3/\text{h}$ são oriundos do rio Atibaia, portanto esse manancial abastece grande parte (78,4%) do município de Sumaré (DAE 2007).

O sistema de tratamento adotado pela ETA II de Sumaré também é convencional modificada, com pré e pós cloração, similar ao da ETA 3 e 4 de Campinas. Na entrada da ETA, a água é recebida em uma caixa de chegada e através de canaletas passa por Calha Parshall (medidor de vazão). Faz-se o pré tratamento com pó de carvão ativado (se necessário) e cloração. A correção do pH é feita com hidróxido de cálcio. O coagulante utilizado é o sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), o valor do pH de floculação está na faixa 6,4 a 6,7. As duas unidades de decantação são do tipo convencional e os raspadores de lodo contínuos, onde é adicionado cal hidratada para corrigir o valor do pH, seguindo-se a filtração com filtro simples de camada de areia. O sistema de lavagem é similar ao de ETA 3 e 4. Após a filtração é feita cloração e por fim a fluoretação (H_2SiF_6). A figura 16 mostra o esquema do sistema de tratamento usado pela ETA II de Sumaré.

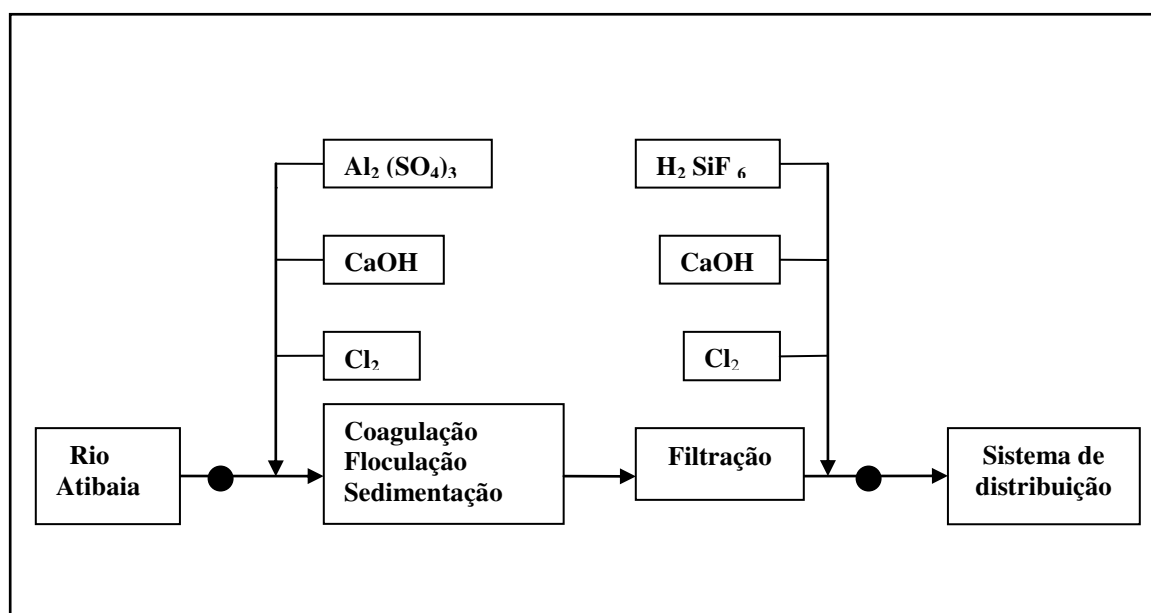


Figura 16: Diagrama do processo de tratamento da ETA 2 de Sumaré.

● indica o local onde as amostras foram coletadas.

4.5. Materiais

Os materiais utilizados para a realização deste trabalho foram:

Reagentes e Solventes

Metanol, grau HPLC , Tédia

Ácido fórmico, P. A. Merck..

Diclorometano, EM Science, grau HPLC.

Padrões

Estrona 99% Sigma

B-Estradiol 98% Sigma

17 α Etinilestradiol 98% Sigma

Estriol 99% Sigma

4- nonilfenol- Supelco

Material para EFS

Cartuchos para extração em fase sólida

Supelclean LC 18, 12mL, 2000 mg - SUPELCO

Papel filtro: Fibra de vidro GF 52-C – SeS.

Sistema de extração em fase sólida.

Bomba de vácuo marca Nova Técnica.

Material de vidro

Pipeta volumétrica de 1 mL- Laborglass.

Balão volumétrico 10 mL- Laborglass

Balão volumétrico 1L- Laborglass.

Frasco âmbar de 15 mL.

Frascos coletores âmbar 5 L.

Equipamentos

Balança Analítica Sartorius CP2250 - 0,0000mg.

Bomba de vácuo.

Espectrômetro de massa : triplo quadrupolo API 5000TM

HPLC Agilente 1100- Applied Biosystems.

Coluna Symetry C18 (Waters, Milford, Massachussets, EUA) com dimensões de 50mm de comprimento e 4,6mm de diâmetro interno, com partículas de 3,5 μ m.

4.6. Estratégia experimental

A estratégia experimental adotada pode ser dividida em 4 etapas: Estudos preliminares (1), otimização e validação do método cromatográfico e espectrométrico (CLAE/EM/EM) (2), otimização e validação do método da extração em fase Sólida (3) e identificação e quantificação dos analitos (4).

4.6.1. Etapa 1: Estudos preliminares

Inicialmente, foi planejada uma coleta mensal no período de um ano, em 6 pontos de três ETA de diferentes localidades (Valinhos, Campinas e Sumaré). Porém, devido a dificuldades financeiras e logísticas, optou-se pelas ETA 3 e 4 de Campinas e ETA 2 de Sumaré. Para se fazer as extrações foi necessário montar um sistema de vácuo de vidro com seis saídas, com frasco retentor de líquido ao centro (figura 20), devido quantidade de amostra utilizada (4L).

As amostras simples de água bruta e água tratada foram coletadas em frascos âmbar de 4 litros, em duplica e armazenadas na geladeira por 24 a 36 horas, tempo necessário para se fazer as extrações em fase sólida, nos meses de dezembro, janeiro e março. As amostras de água bruta foram filtradas primeiramente em papel filtro comum e depois em papel 0,45 µm da Schleicher & Schuel, por três vezes.

As extrações foram feitas baseadas em procedimentos descritos na literatura (BARONTI 2000): os cartuchos do tipo octadecil, posicionados no sistema de extração foram condicionados com: 10 mL de diclorometano/metanol 80:20, 5mL de metanol, 20 mL de água destilada, tomando-se cuidado para não secar os cartuchos. Em seguida, as amostras foram percoladas através dos mesmos, a uma vazão média de 1 a 10 mL por minuto. As amostras de água bruta entupiam os cartuchos e mesmo à vácuo, passaram muito lentamente pelos mesmos, isto ocorreu devido a escolha errada do meio filtrante e foi corrigido mais tarde usando filtros de fibra de vidro.

Devido a dificuldades de método de análise (CLAE-MS-MS) os cartuchos foram guardados em freezer até a otimização dos mesmos (na etapa 2). A eluição dos analitos dos cartuchos foi feita com 15 mL de diclorometano/metanol 80/20 v/v em frascos de cor âmbar de 20mL. Secou-se as soluções em gás Nitrogênio a temperatura ambiente. Em seguida, dissolveu-se em 1mL de metanol e transportou-se as amostras para o centro de química e meio ambiente no IPEN- USP, em São Paulo, para serem analisadas por cromatógrafo CLAE-MS-MS.

4.6.2. Etapa 2: Otimização e validação do método de análise : CLAE/EM/EM

A técnica utilizada para análise das amostras de água é a CLAE-EM/EM. Atualmente, este é um dos equipamentos mais sensíveis para analisar amostras bioanalíticas complexas, projetado para baixo limite de detecção.



Figura 17. Equipamento de espectrometria de massa acoplado a CLAE

As análises foram realizadas em sistema CLAE/EM/EM empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha)

equipado com bomba quaternária, sistema degaseificador, amostrador automático com controle de temperatura e forno de coluna termostatizado, acoplado a um espectrômetro de massas triploquadrupolo API 5000TM (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canadá) apresentado na Figura 17.

4.6.2.1. Condições de análise do sistema CLAE/EM/EM

Espectrômetro de massas

O analito foi ionizado na fonte de íons Turbo VTM operada como TurboIonSpray[®] (electrospray) no modo de íons negativos. O capilar do electrospray foi mantido em -4500 V e a temperatura de 650°C foi aplicada nos “turbo heaters” para dessolvatação da amostra e evaporação da fase móvel. Nitrogênio foi utilizado como cortina de gás de dessolvatação (“Curtain Gas”) à pressão de 15 psi na fonte de íons e como gás de colisão na célula LINACTM (Q2) à pressão equivalente a um set point de 6 u.a. (unidades arbitrárias). Ar sintético ultrapuro foi utilizado como gás nebulizante e como gás secante na fonte de ionização, ambos à pressão de 55 psi. Os analitos foram otimizados através da infusão de uma solução de 200 ng mL⁻¹ preparada em metanol/água (50/50, v/v) com 5,0 mmol L⁻¹ de acetato de amônio, sob fluxo de 10 µL min⁻¹.

Todas as análises foram realizadas em modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM - otimização do equipamento para analisar o íon precursor) selecionando 2 transições de m/z para o analito, exceto para o nonilfenol. Um “*dwell time*” de 100 ms foi empregado para monitoramento das transições dos analitos com um tempo de pausa entre transições de 5 ms.

Os quadrupolos Q1 e Q3 foram operados em resolução unitária (0,7 +/- 0,1) e o potencial de entrada do quadrupolo Q0 foi de 10 V durante toda a otimização e análises (figura 18).

As aquisições e o tratamento dos dados foram realizados utilizando o software Analyst, versão 1.4.2. O potencial do orifício (DP), a energia de colisão (CE) e o potencial de saída da

cela de colisão (CXP) são parâmetros otimizados para cada transição de m/z dos analitos no modo MRM e são mostrados na tabela 11, a figura 18 mostra a região onde é aplicada essa energia para otimização de cada transição.

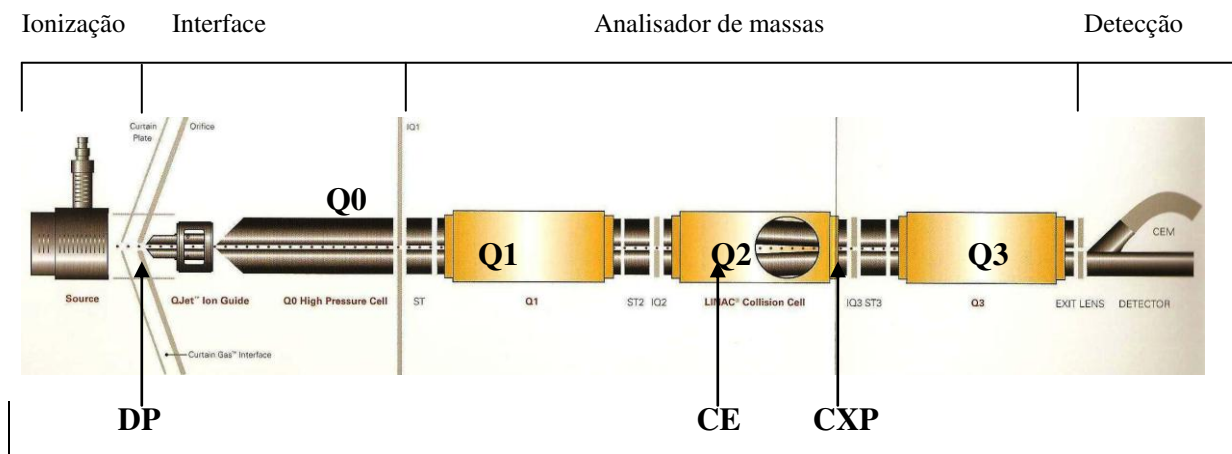


Figura 18: Esquema do sistema de espectrometria de massas triploquadrupolo API 5000

Tabela 11. Parâmetros otimizados para os analitos no modo MRM.

Analitos	Transição (m/z)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Nonilfenol	219,1>106.0	-120	-30	-39
Estrona	269,0>143.0	-130	-92	-43
	269,0>145.0		-54	-53
Estradiol	271,0>143.0	-155	-88	-45
	271,0>145.0		-58	-51
Estriol	287,0>143.0	-155	-90	-43
	287,0>145.0		-60	-47
Ethinylestradiol	295,0>143.0	-150	-84	-49
	295,0>145.0		-62	-49

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência(CLAE)

Os analitos foram cromatografados em uma coluna Symetry C18 (Waters, Milford, Massachussets, EUA) com dimensões de 50mm de comprimento e 4,6mm de diâmetro interno, com partículas de 3,5 μ m. A coluna analítica foi mantida sob temperatura de 20°C durante as análises e um volume de 20 μ L da amostra foi injetado no LC-MS/MS.

A fase móvel consistiu de solução aquosa de acetato de amônio a concentração de 5,0 mmol L⁻¹ (Fase A) e uma solução contendo metanol/água (95/5, v/v) com adição de acetato de amônio à concentração de 5,0 mmol L⁻¹ (Fase B). As amostras foram injetadas em sistema de gradiente de eluição, apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Gradiente de eluição utilizada na CLAE

Evento	Tempo (min)	Fluxo (μ L min ⁻¹)	A (%)	B (%)
Equilíbrio	3	700	80	20
1	1	700	10	90
2	5	700	0	100
3	8	700	0	100

Os Limites de Quantificação e Detecção dos DE em estudo foram determinados considerando-se uma razão sinal/ruído igual a 3 e 10, respectivamente.

4.6.3. Etapa 3: Otimização e validação do método da extração em fase sólida

Numa segunda etapa deste trabalho empregou-se procedimentos adotados pela USEPA (1997) e nos descritos por GHISELLI (2006) para extração em fase sólida, adaptando e otimizando-o como mostra o fluxograma da figura 19.

Filtrou-se em filtro de fibra de vidro 0,45 μ m (da marca S & S) 4,0 litros da amostra da água tratada e 1 litro de água *in natura* sob vácuo. O cartucho foi condicionado com 10 mL de

metanol e 5 mL de água. Após a percolação, os analitos foram eluidos com 10 mL de metanol. Em seguida, o volume do eluido foi reduzido até secar em ambiente de nitrogênio. Após a secar, redissolveu-se os analitos em 5 mL de metanol e, em seguida, foram analisadas por CLAE-MS-MS.

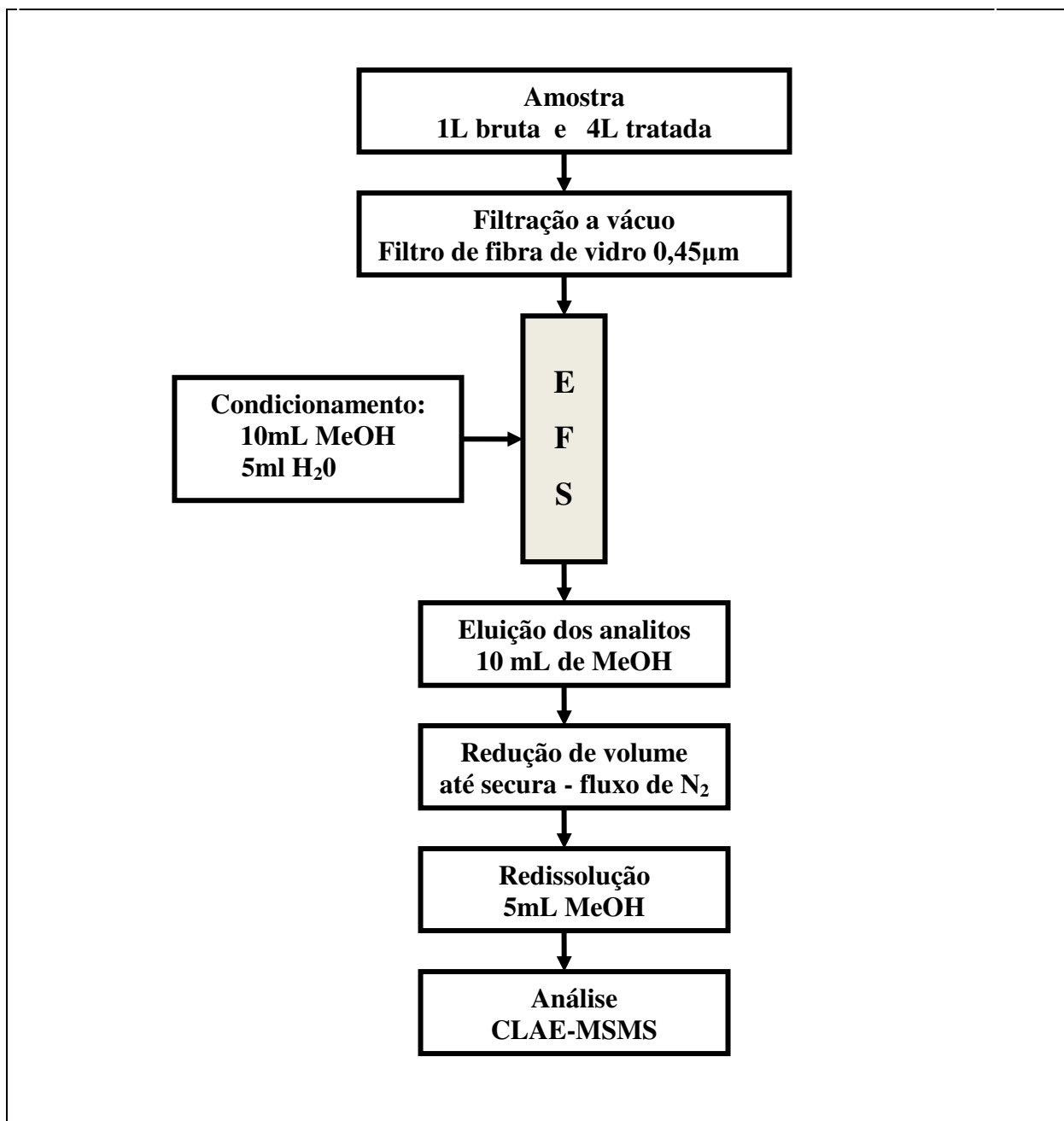


Figura 19: Fluxograma para EFS empregando cartuchos C18

4.6.4. Procedimento e preparo das amostras para recuperações

Preparo das soluções padrão

Soluções padrão foram preparadas pesando-se em uma balança de precisão ($\pm 0,0005$ mg) 2 mg de cada analito (E, E2, EE2, E3 e NP) e dissolvendo em um balão volumétrico com um pouco de metanol, e completando-se até 10 mL. A concentração das soluções padrão resultantes foi de 0,2mg/mL. A operação foi repetida para se obter solução padrão de concentração 0,5mg/mL e 1mg/mL. Essas soluções, chamadas de soluções estoque, foram transferidas para frascos individuais (vidro âmbar com tampa de teflon). As soluções estoque foram preparadas para cada análise realizada. As soluções trabalho foram obtidas misturando-se 1 mL de solução estoque individual de concentração conhecida (0,2mg/mL, 0,5mg/mL e 1mg/mL), fazendo-se diluições sucessivas dessa nova solução até a concentração de 2ng/mL, 5 ng/mL e 10ng/L.

Fortificação das amostras

O procedimento de fortificação consistiu em adicionar 1 mL (pipeta volumétrica) de solução trabalho de concentração 2ng/mL em um balão volumétrico de um litro, completando com água destilada. A operação foi repetida para as concentrações de 5ng/L e 10ng.

Condicionamento do cartucho

Os cartuchos comerciais de marca Supelco LC-18 empregadas nos ensaios foram fixados ao sistema de extração em fase sólida e condicionados com 10 mL de metanol seguidos de 5mL de água destilada.

Percolação e eluição dos analitos.

Após o condicionamento do cartucho, as amostras fortificadas foram percoladas (passadas pelo cartucho) numa vazão média de 3mL/min. Após a percolação, eluiu-se os analitos com 10 mL de metanol. O eluido foi coletado em frasco de cor âmbar de 15 mL. Em seguida, este volume foi reduzido até secar em nitrogênio. Depois de seco, foi redissolvido em 5 mL de metanol. Os frascos foram fechados hermeticamente, colocados em isopor com

gelo seco e levados para o Centro de Química e Meio Ambiente do IPEN-USP para análise CLAE-MS-MS.

A recuperação, uma medida da eficiência do processo de extração dos compostos de interesse, foi obtida em duplicata para todas as extrações avaliadas.

4.6.5. Etapa 4: Identificação e quantificação dos analitos

Após validação dos métodos de análise e de extração em fase sólida, foram realizadas três coletas (em duplicata) em frasco âmbar de 4,5 litros em: 14/08, 27/08 e 03/09 de 2007.

Material e método da extração em fase sólida da água *in nature* e tratada

Foram coletadas amostras durante três semanas consecutivas, os horários de coleta e as condições climáticas são mostrados na tabela 13. A coleta da água tratada foi feita após o tempo de detenção: 1,30 h na ETA de Sumaré e 3,00 h na ETA de Campinas, a razão dessa diferença é que Campinas trata um volume maior de água.

Tabela 13: Data, hora, clima e vasão no instante da coleta

Data	ETA	Vasão L/s	Hora da coleta		Clima
			Inatura	tratada	
14/08/07	Sumaré	440	9:05	10:35	☀
14/08/07	Campinas	2.453	10:00	13:00	☀
27/08/07	Sumaré	440	12:15	13:45	☀
27/08/07	Campinas	2.883	10:00	13:00	☀
03/09/07	Sumaré	430	10:45	12:15	☀
03/09/07	Campinas	2.919	9:00	12:00	☀

Após as coletas as amostras de água *in natura* e tratadas (4,5L) coletadas nas ETA de Campinas e de Sumaré foram guardadas em geladeira. Filtrou-se 1 litro da água *in natura* duas vezes em filtro de fibra de vidro 0,45 μ m (da marca S & S). As amostras (*in natura*) foram adicionadas a um balão volumétrico de 1 litro.



Figura 20: Sistema de EFS da amostra *in natura* - ETA Campinas e Sumaré em duplicata.

Os cartuchos foram fixados no sistema de extração (sistema de vácuo de vidro com seis saídas, com frasco retentor de líquido ao centro) e condicionados com 10 mL de metanol e 5 mL de água destilada. Em seguida, sem deixar o cartucho secar, iniciou-se a percolação das 4 amostras de 1 litro (2 da ETA de Sumaré e 2 da ETA de Campinas), figura 20. Após o condicionamento dos cartuchos, com metanol e água destilada, as amostras tratadas foram pré-concentradas pela percolação de 4 L de água, como ilustrado na figura 21.



Figura 21: EFS : 2 amostras da ETA Sumaré, 2 amostras ETA Campinas e 1 amostra fortificada.

Depois que todas as amostras foram percoladas nos cartuchos, foi feita a eluição dos analitos, com 10 mL de metanol, num fluxo médio de 1 mL por minuto, em aparato mostrado na figura 22.



Figura 22: Sistema de eluição dos analitos percolados no cartucho.

Após a eluição dos analitos no cartucho, cada amostra foi transferida para um frasco âmbar de 15 mL. A secagem das amostras foi feita com nitrogênio líquido num período de 4,30 horas. Os frascos foram fechados hermeticamente, colocados em isopor com gelo seco e levados para o Centro de Química e Meio Ambiente do IPEN-USP para análise por CLAE-MS/MS.

No capítulo seguinte são apresentados e discutidos os principais resultados assim obtidos para os disruptores endócrinos investigados.

**“ Temam a Deus e glorifiquem-no,
pois chegou a hora do seu juízo.
Adorem aquele que fez os céus, a
terra , o mar e as fontes d’água”.**
Apocalipse 14:7

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinação dos DE, inicialmente baseou-se o método de extração em BARONTI *et al* (2000). As amostras foram coletadas em duplicatas e transportadas imediatamente para o laboratório e guardadas em geladeira. Primeiramente, passaram-se as amostras de água bruta, duas vezes em membrana filtrante (ME 25/21-STP da S&S) . Os cartuchos entupiam ao se fazer a percolação, mesmo quando as amostras eram filtradas por quatro vezes. Entretanto, quando se utilizou micro filtro de fibra de vidro (GF 52-C marca SeS) este problema foi sanado. Num período de 48 horas todas as amostras eram percoladas no cartucho e guardadas em freezer, enquanto se fazia a otimização do método de análise por CLAE/EM/EM. Foi necessário encontrar uma coluna que fosse adequada para análise de todos DE em estudo, o que dificultou e atrasou o trabalho mais do que o previsto. Portanto, quando se analisou as amostras nenhum dos DE em estudo foi detectado, devido ao longo tempo de estocagem (seis meses).

5.1 Validação da metodologia CLAE/EM/EM

A segunda etapa do trabalho iniciou-se com a otimização do método analítico CLAE/EM/EM. As Figuras 23 a 27 apresentam os espectros de massas EM/EM de soluções padrão obtidos durante a otimização e seleção dos íons produtos a serem utilizados no modo MRM. O pico mais abundante é o do íon precursor dos DE (são as moléculas de E1, E2, E3, EE2 e NP desprotonados: $[M-H]^-$) os demais picos são fragmentações características para cada um dos DE estudados.

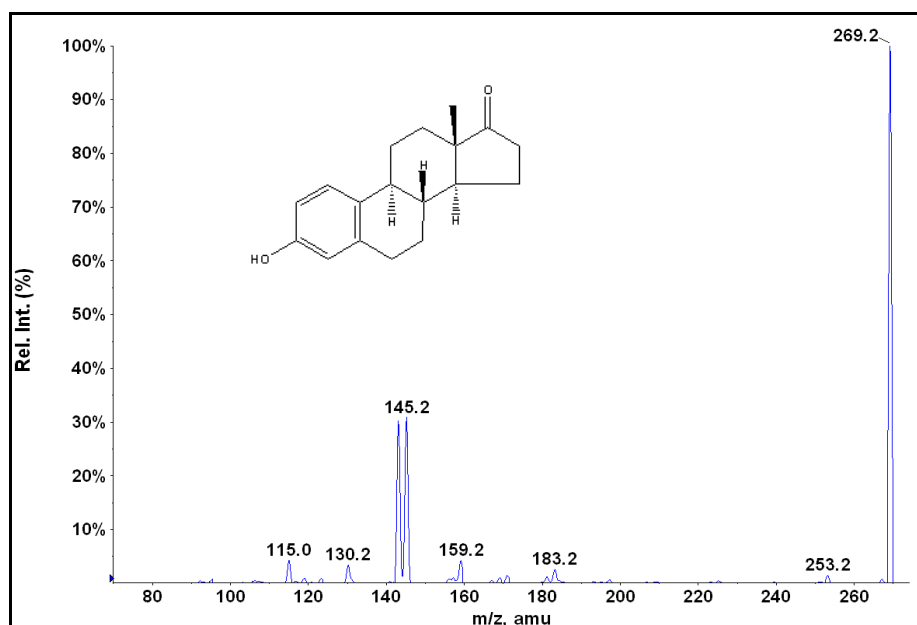


Figura 23. Espectros de massa EM/EM do padrão do composto estrona (E1), obtido em ionização por eletrospray no modo de íons negativos.

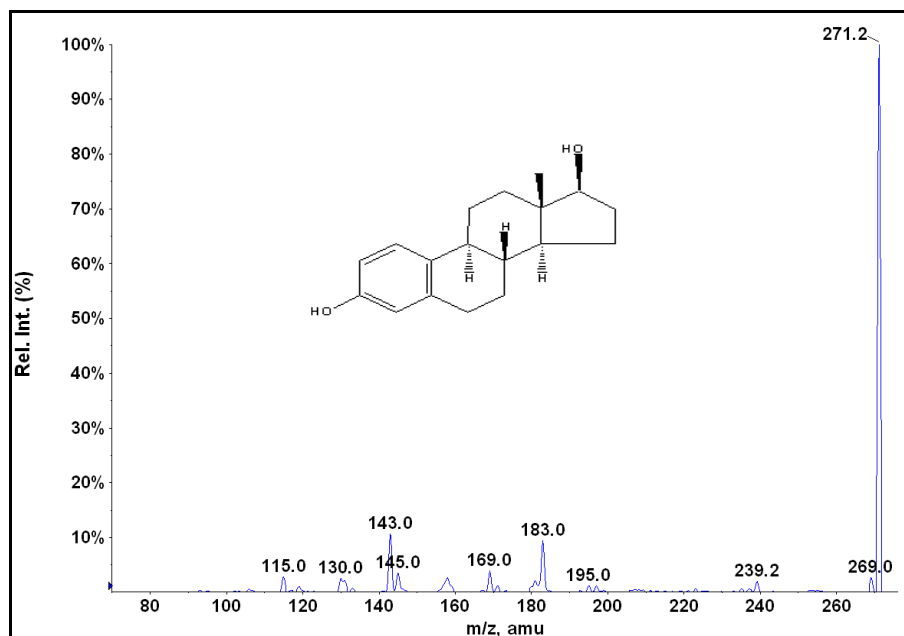


Figura 24. Espectros de massa EM/EM do padrão do composto estradiol (E2), obtido em ionização por electrospray no modo de íons negativos.

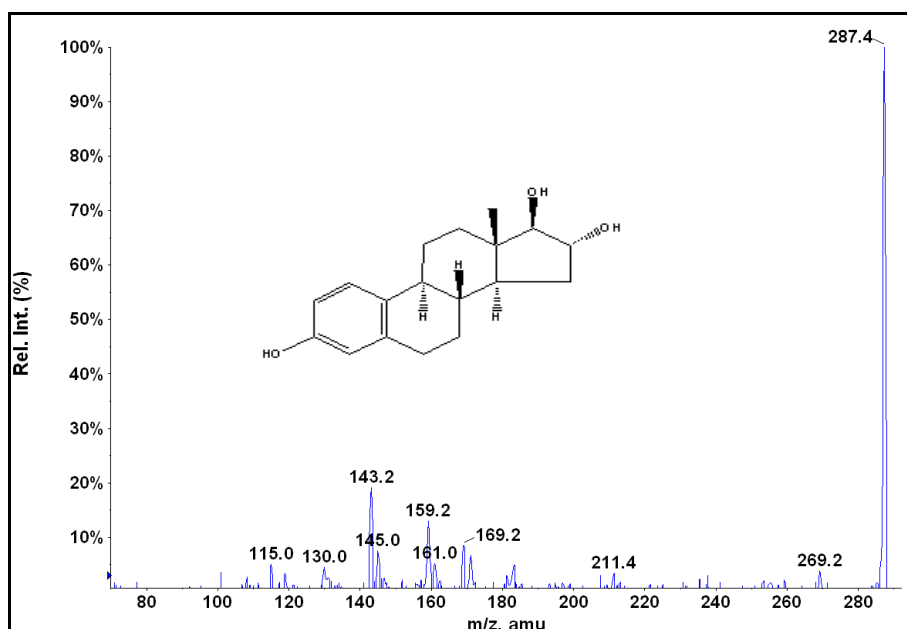


Figura 25. Espectros de massa EM/EM do padrão do composto estriol (E3), obtido ionização por electrospray no modo de íons negativos.

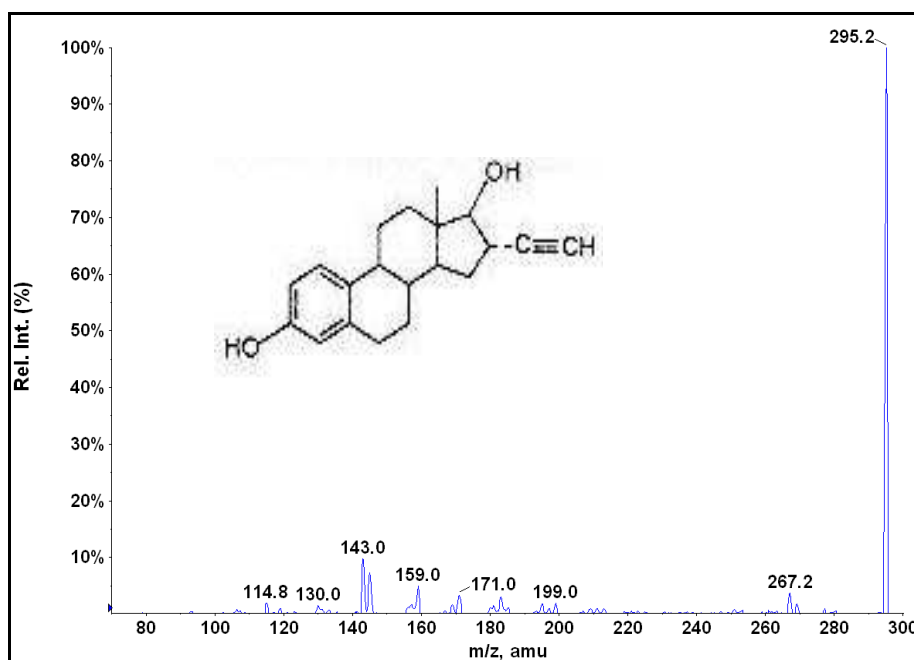


Figura 26. Espectros de massa EM/EM do padrão do composto etinilestradiol (EE2), obtido em ionização por electrospray no modo de íons negativos.

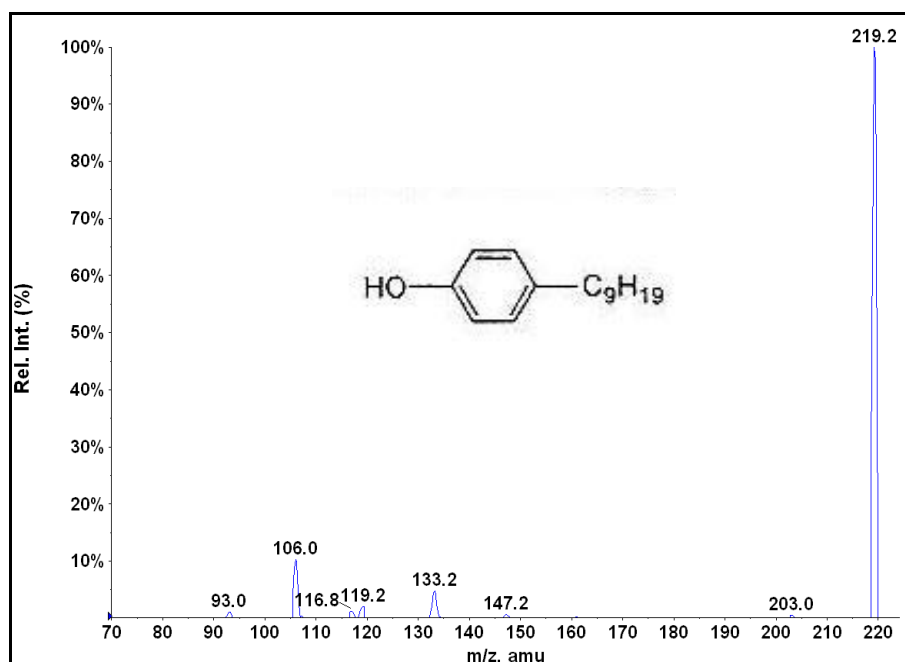


Figura 27. Espectros de massa EM/EM do padrão do composto nonilfenol (NP), obtido em ionização por electrospray no modo de íons negativos.

O espectrômetro de massas foi otimizado em modo MRM, pois o emprego desta técnica fornece informações referentes a retenção do composto analisado na coluna, as transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade.

Estabelecidas as condições de ionização, seguidas da eluição dos compostos em coluna de fase reversa, conforme descrito na parte experimental, obtiveram-se os cromatogramas das amostras padrão mostrados nas figuras 28 a 32.

No espectro de massa do nonilfenol (figura 27), o íon de m/z 219.0 $[M-H]^-$ é o precursor. No cromatograma do Nonilfenol (figura 28), apenas uma transição foi monitorada e é indicada pela cor azul (m/z 219,1>106,0), com tempo de retenção de 6,61 minutos na coluna cromatográfica.

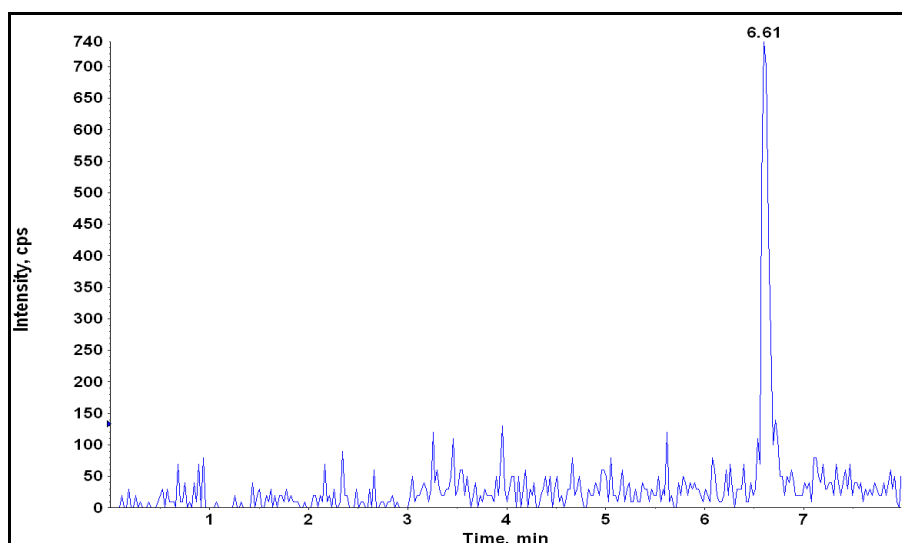


Figura 28. Cromatograma do composto Nonilfenol (NP) em concentração de 0,50 ng/ mL (transição: m/z 219,1>106.,0).

Nas figuras 29 a 32 as cores azul e vermelha nos cromatogramas indicam as duas transições monitoradas para os demais compostos padrão. As transições m/z 269.0>145.0 em azul e m/z 269.0>143.0 em vermelho monitoradas para o estrona, podem ser vistas na figura 29 com um tempo de retenção de 3,82 minutos.

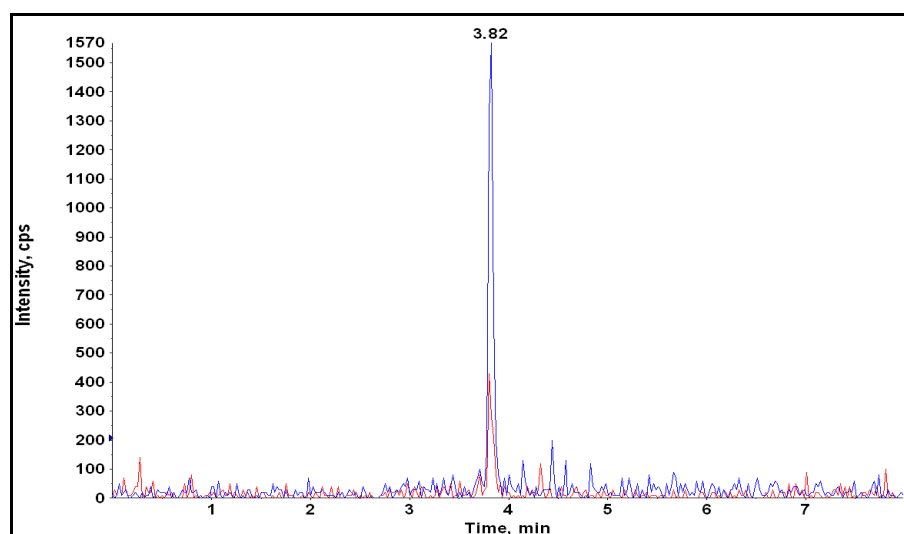


Figura 29. Cromatograma do composto Estrona (E1) em concentração de 0,25 ng/mL (transições: m/z 269.0>145.0 em azul e m/z 269.0>143.0 em vermelho).

Pode-se observar que o estradiol apresenta tempo de retenção de 3,78 minutos, o estriol 3,21 minutos, e o etinilestradiol foi de 3,69 minutos.

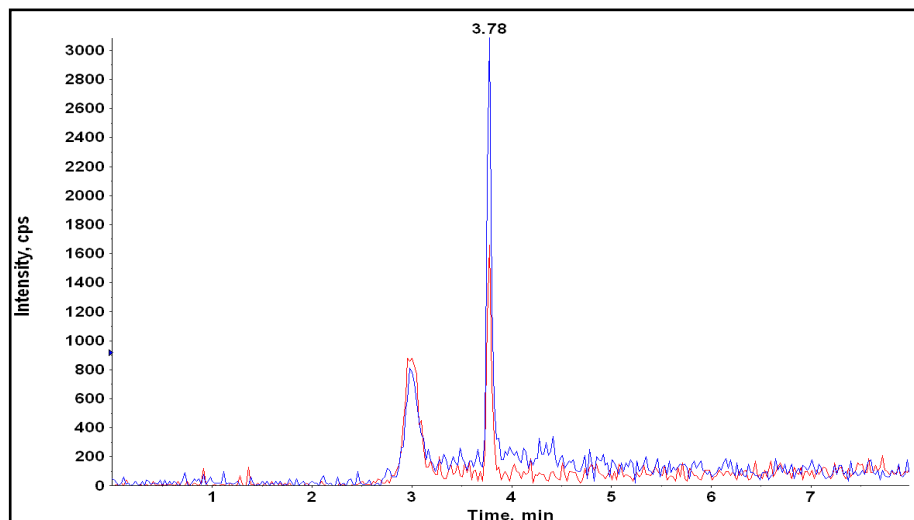


Figura 30. Cromatograma do composto Estradiol (E2) à concentração de 5,0 ng/ mL (transições: m/z 271.0>145.0 em azul e m/z 271.0>143.0 em vermelho).

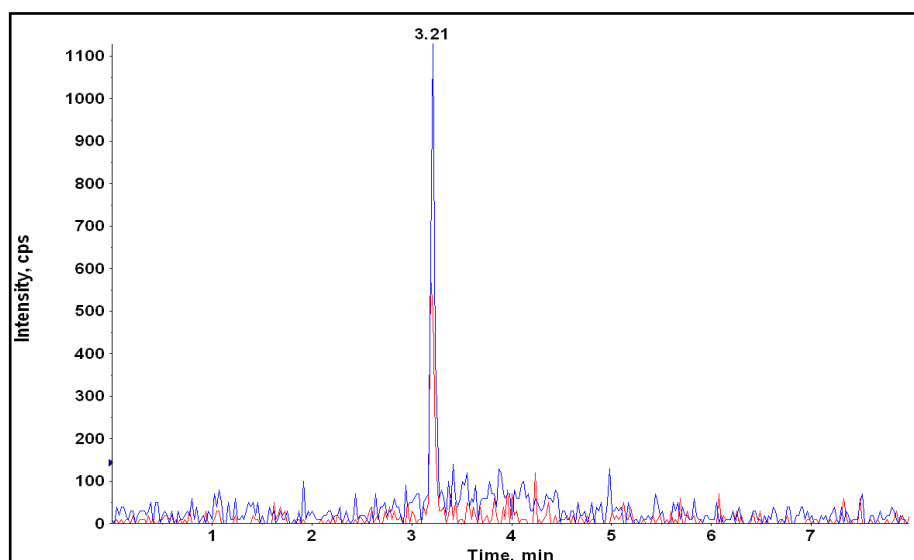


Figura 31. Cromatograma do composto Estriol (E3) à concentração de 1,00 ng/ mL (transições: m/z 287.0>145.0 em azul e m/z 287.0>143.0 em vermelho).

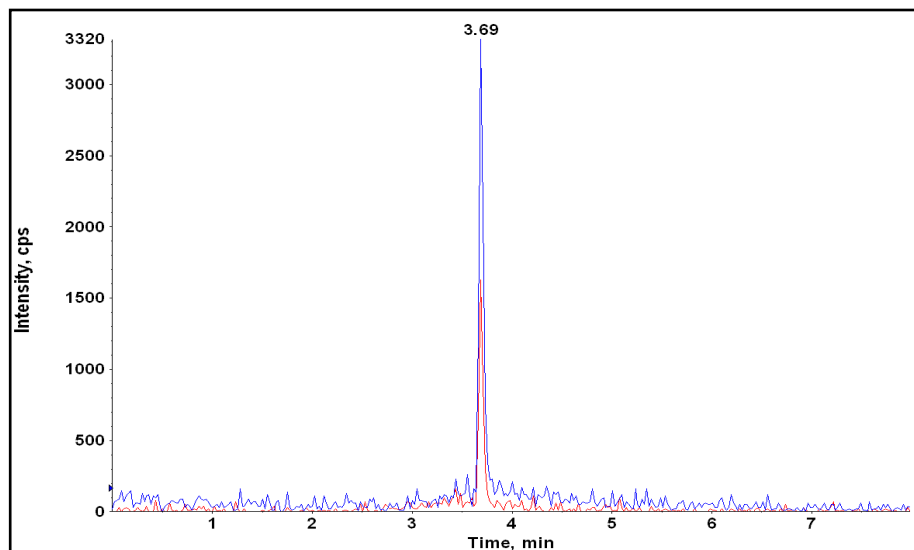


Figura32: Cromatograma do composto Etinilestradiol (EE2) à concentração de 1,00 ng/ mL (transições: m/z 295.0>145.0 em azul e m/z 295.0>143.0 em vermelho).

O cromatograma mostrado na figura 33 demonstrou a ausência destes compostos na água destilada e, por este motivo, a mesma foi utilizada como branco para fortificação e teste de recuperação do método.

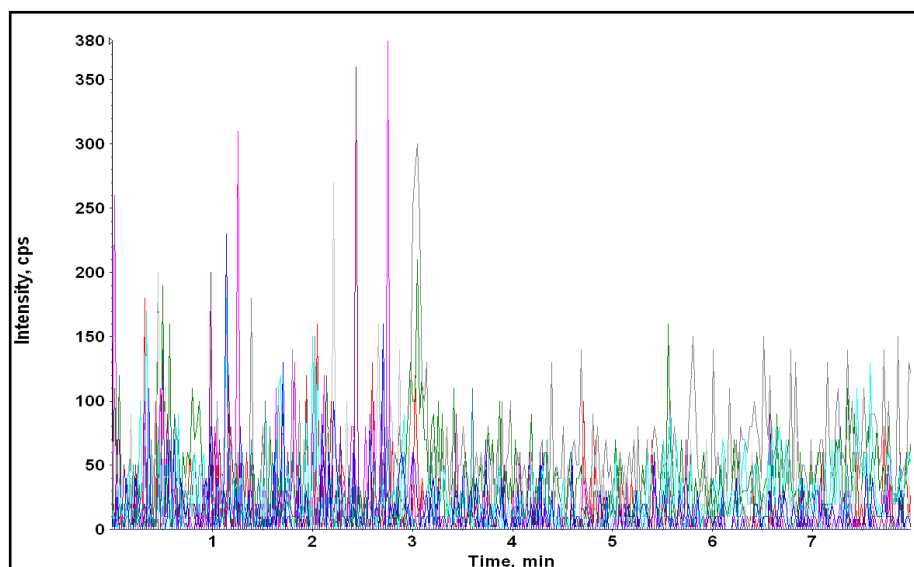


Figura 33: Cromatograma do branco utilizado para as fortificações

Após a otimização do método de análise, otimizou-se o método de extração em fase sólida. Inicialmente, fortificou-se amostras de 1 litro e 4 litros em concentrações de 2,0 e 0,5 ng/L, respectivamente, e observou-se que a recuperação era semelhante na fortificação quando se trabalhava com 1 litro ou 4 litros, como mostra a tabela 14. De início, não foi detectado o nonilfenol, sendo necessária a otimização do método para determinação das concentrações do mesmo.

Tabela 14: Recuperação dos analitos na fotificação 2,0ng/L e (0,5ng/L).

Fortificação	Recuperação (%)				
	E1	E2	E3	EE2	NP
F1 - 1 litro (2,0ng/L)	104	124	111	73	N/A
F2 - 4 litros (0,5ng/L)	104	139	110	79	N/A

Depois da otimização do método analítico para o nonilfenol, repetiram-se as fortificações em triplicata, nos níveis de 10,00 e 50,00 ng L⁻¹, como mostra a tabela 15. Algumas recuperações apresentaram resultados exagerados, como 4.120% de NP, 1.830% de E1 ou 1.330 de E3. Ao procurar descobrir razão de tais resultados tão discrepantes, verificou-se que a pipeta automática, que foi utilizada na redissolução das amostras extraídas após secagem não estava devidamente calibrada.

Tabela 15: Recuperação dos analitos na fortificação 10 ng/L e 50ng/L.

Fortificação	Recuperação (%)				
	E1	E2	E3	EE2	NP
F1 A-10ng/L	102	145	86,3	123	N/A
F1 B-10ng/L	182	308	287	129	4120
F1 C-10ng/L	143	170	114	149	25,1
F2 A-50ng/L	140	105	54,2	99,4	80,9
F2 B-50ng/L	120	99,7	44,1	87,8	103
F2 C-50ng/L	1830	105	1330	97,5	242

Ao fazer as recuperações seguintes, foi tomado o cuidado de usar somente pipetas volumétricas, por não se dispor de pipetas automáticas devidamente calibradas. Os resultados das recuperações (tabela 16.) estão dentro dos intervalos aceitáveis para análise de traços, que geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (RIBANI et al., 2004) e revelam a eficiência do método de extração em fase sólida, ou seja, a exatidão do processo. O fato de não verificar a calibração da pipeta automática utilizada, redundou em perda de tempo e material.

Tabela 16: Recuperações dos DE após otimização da metodologia

Fortificação	Recuperação (%)				
	E1	E2	E3	EE2	NP
F1	135	111	118	123	132
F2	96,6	100	100	94,7	87
F3	94	92,5	85,5	122,5	78
Média	108,4	101,6	100	113,4	99

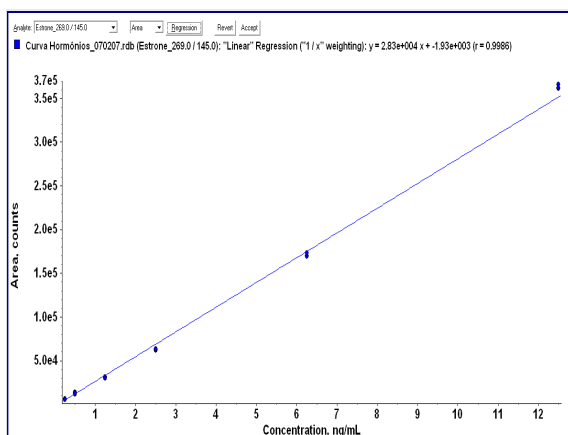
Estes resultados são compatíveis com estudos realizados por KIM *et al* (2007) que obteve 68 a 112% de recuperação, BECK *et al* (2005) foi de 78 a 91%, BARCELÓ 1999 foi de 78,8 a 100% e BARONTI 2000 foi de 87 a 90%.

Os Limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LD) para as mostras de água bruta e tratada são mostradas na tabela 17.

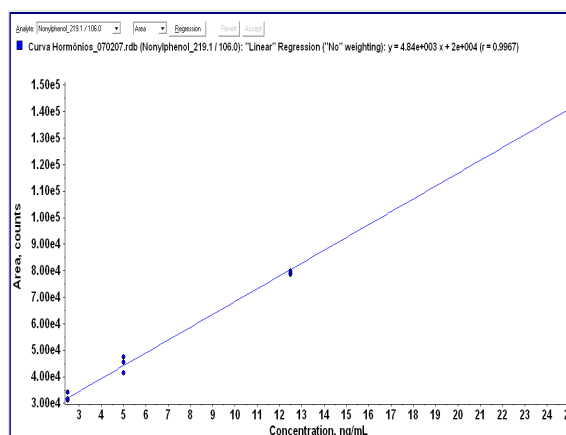
Tabela 17: Limite de detecção e quantificação.

DE	Água tratada (4 L)		Água Bruta (1 L)	
	LOQ (ng /L)	LD (ng/ L)	LOQ (ng /L)	LD (ng /L)
E1	0,03	0,01	0,125	0,04
E2	0,65	0,21	2,5	0,83
E3	0,15	0,05	0,5	0,16
EE2	0,65	0,21	2,5	0,83
NP	0,3	0,01	1,25	0,41

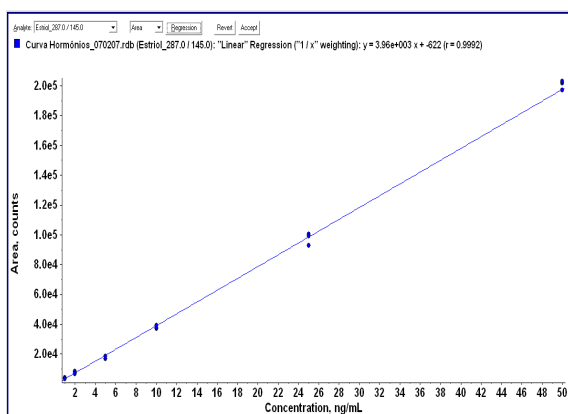
As curvas de calibração para o nonilfenol, estrona, estriol, estradiol e etinilestradiol são apresentadas na figura 34.



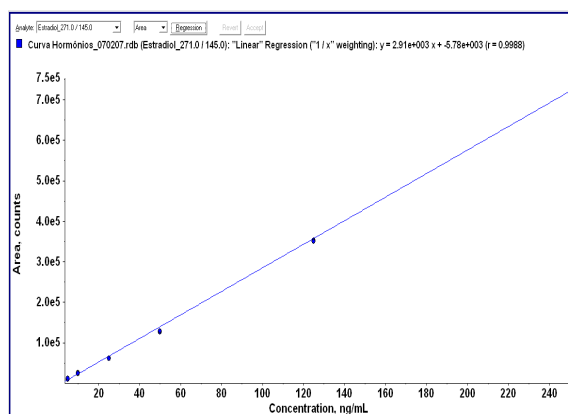
Nonilfenol (m/z 219.1>106).



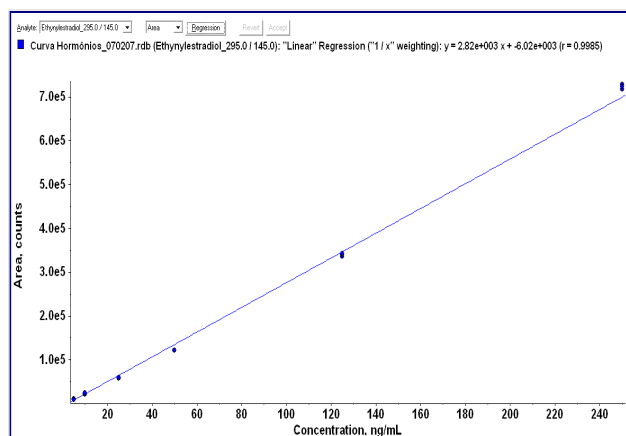
Estrona (m/z 269.0>145.0).



Estriol (m/z 287.0>145.0).



Estradiol (m/z 271.0>145.0).



Etinilestradiol (m/z 295.0>145.0).

Figura 34. Curvas analíticas típicas de calibração dos DEs estudados.

5.2. Determinação de DEs nas águas bruta e tratada das ETAs de Campinas e Sumaré.

Após otimização do método CLAE-EM/EM, foram coletadas as amostras de água bruta e tratada das ETAs de Campinas e Sumaré e feitas as extrações, conforme descrito no capítulo anterior. As figuras 35 e 39 apresentam os cromatogramas das amostras de água bruta coletada em 14/08/07. A figura 35 apresenta os cromatogramas padrão do nonilfenol (NP), o íon produto no cromatograma da amostra de água bruta com tempo de retenção é 6,59 minutos confirma a presença de NP.

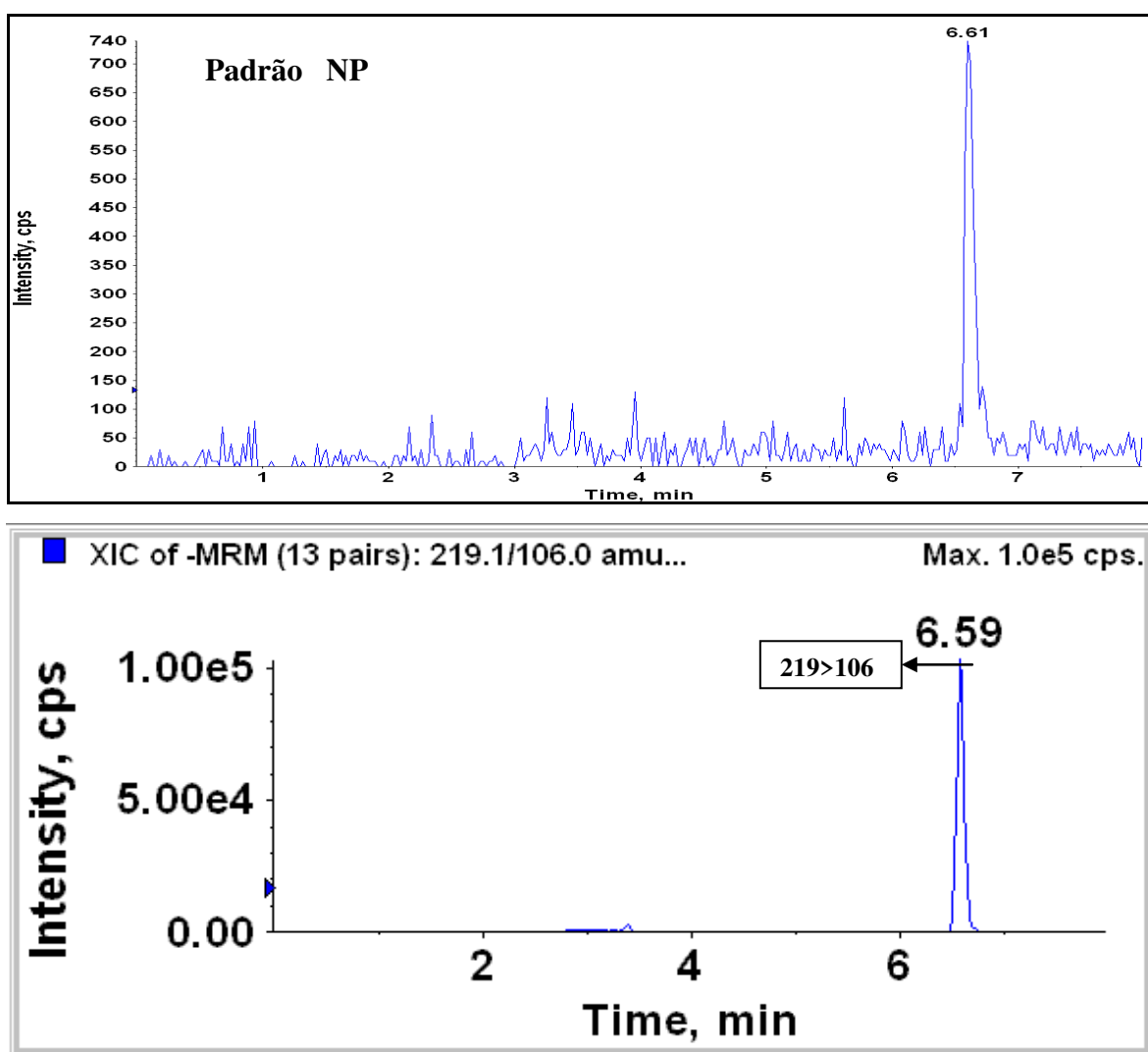


Figura 35: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de nonilfenol (coleta em 14/08/07).

A presença das transições típicas monitoradas no modo MRM (padrões) fundamenta a presença dos DE estudados. O cromatograma da amostra de água bruta de Campinas (figura 36) apresenta a presença do íon produto com tempo de detenção de 3,74 minutos, confirmando a presença do 17 β Estradiol (E2).

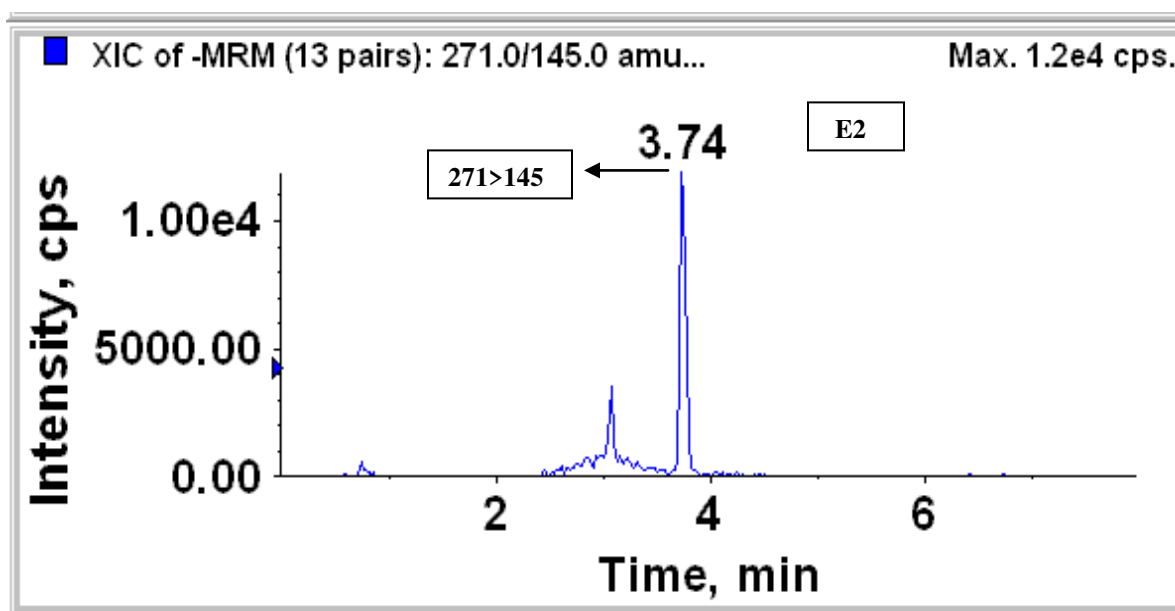
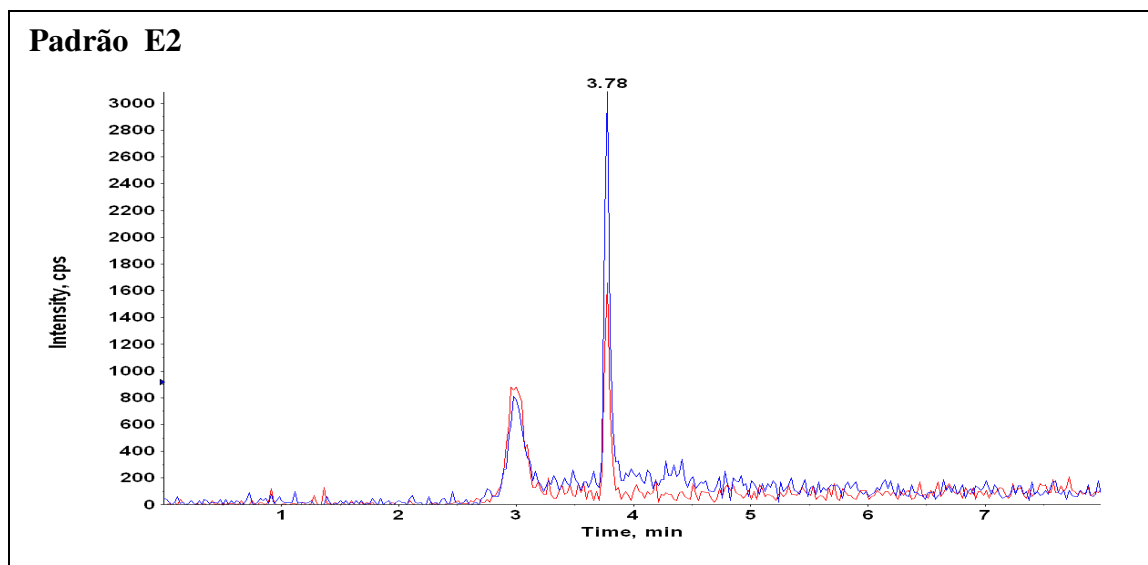


Figura 36: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de 17 β Estradiol (coleta em 14/08/07).

Estas amostras apresentaram a presença do 17 α Etinilestradiol (EE2), que foi confirmado pelas transição típica m/z 295,0>145,0 com tempo de detenção de 3,69 minutos, mostrado na figura 37..

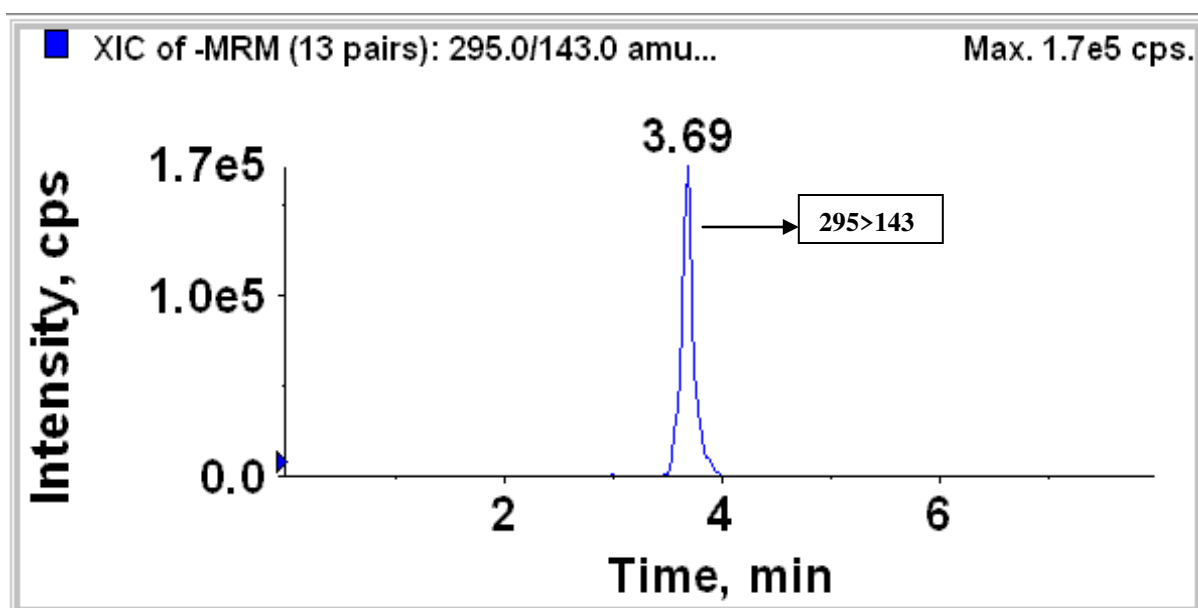
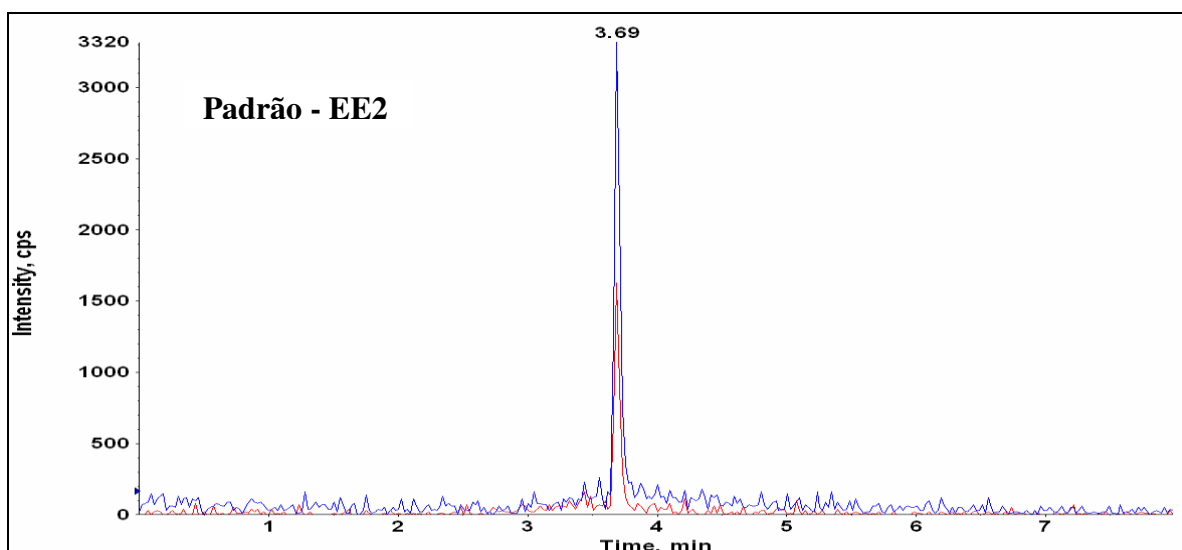


Figura 37: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de 17 α Etinilestradiol (coleta em 14/08/07).

A presença de Estrona (E1) e Estriol (E3) também foi confirmada através das transições típicas apresentados na figura 38 e 39..

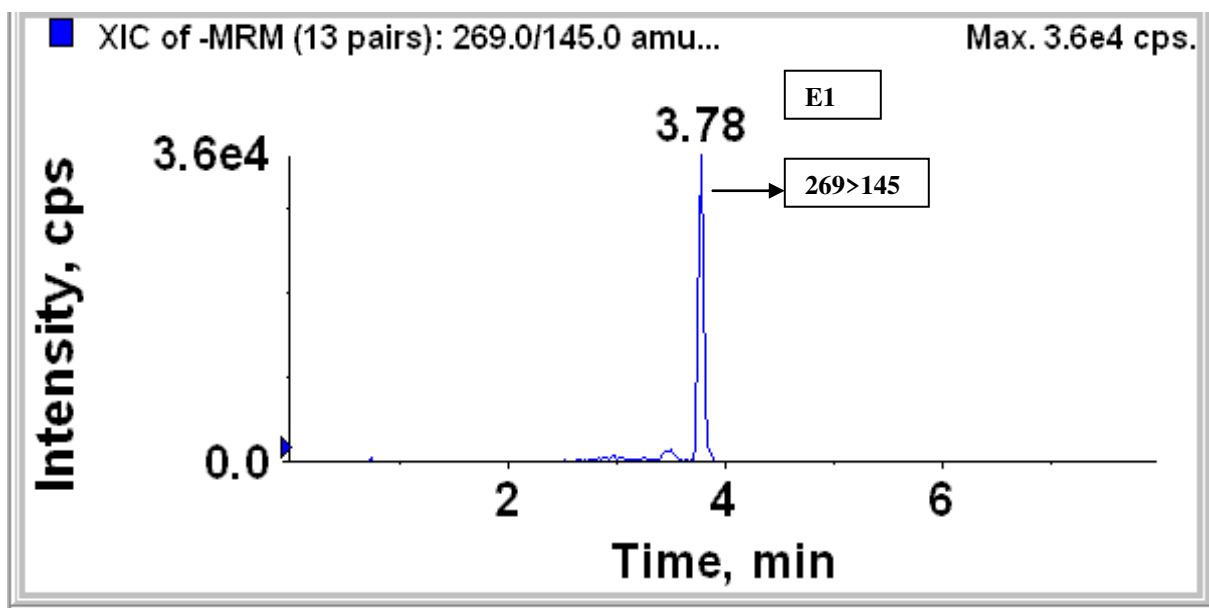
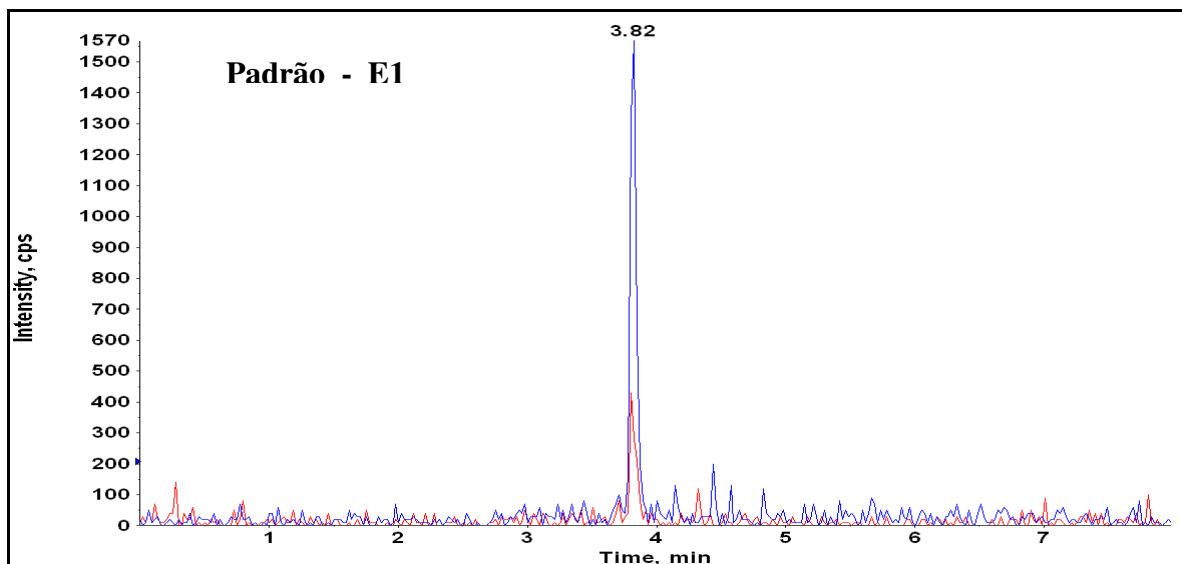
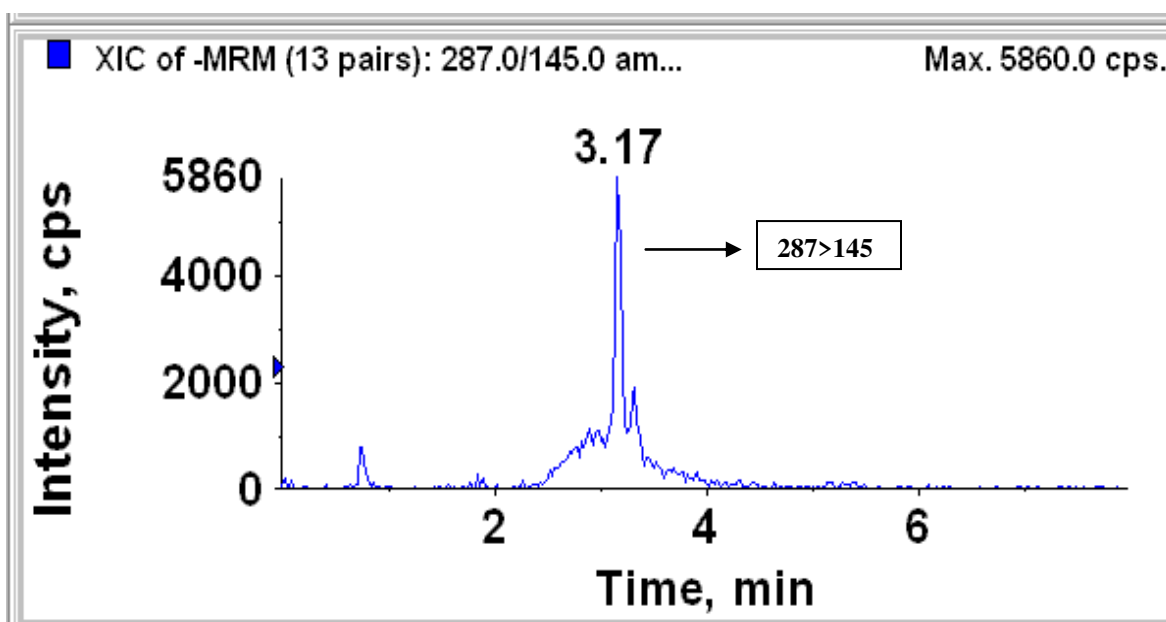
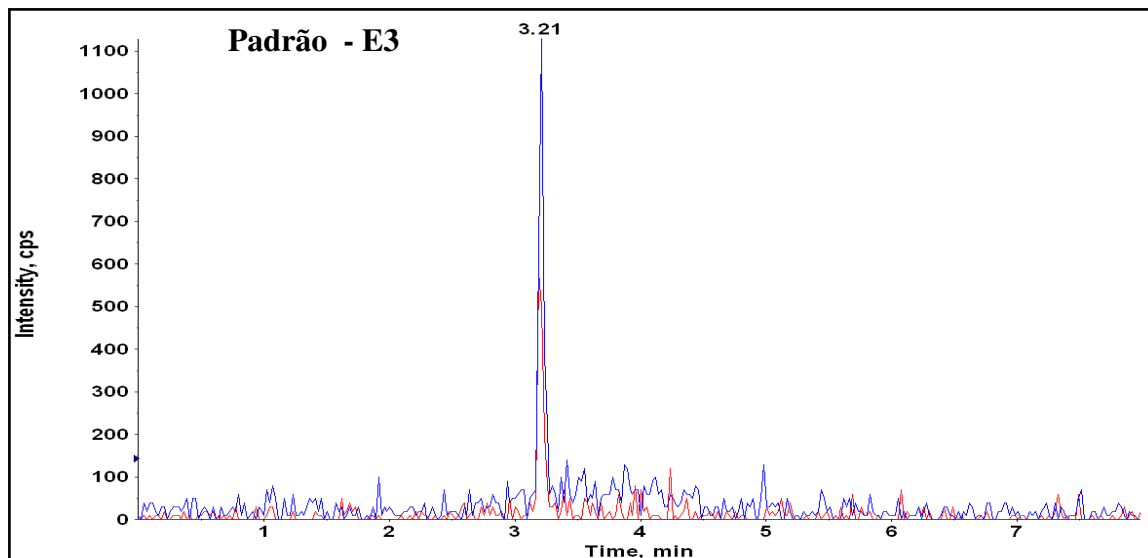


Figura 38: Cromatogramas do Padrão e das amostras da água bruta de Campinas, com a presença de Estrona (coleta em 14/08/07).



Figuras 39: Cromatogramas do Padrão e das amostras de água bruta de Campinas, com a presença de Estriol (coleta 14/08/07).

]

As amostras de água tratada coletadas em 14/08/07 na ETA de Campinas, foram analisadas e também mostraram a presença de Estradiol (E2), Estrona (E1), Estriol (E3), Etinilestradiol (EE2) e nonilfenol (NP), conforme os cromatogramas mostrados na figura 40.

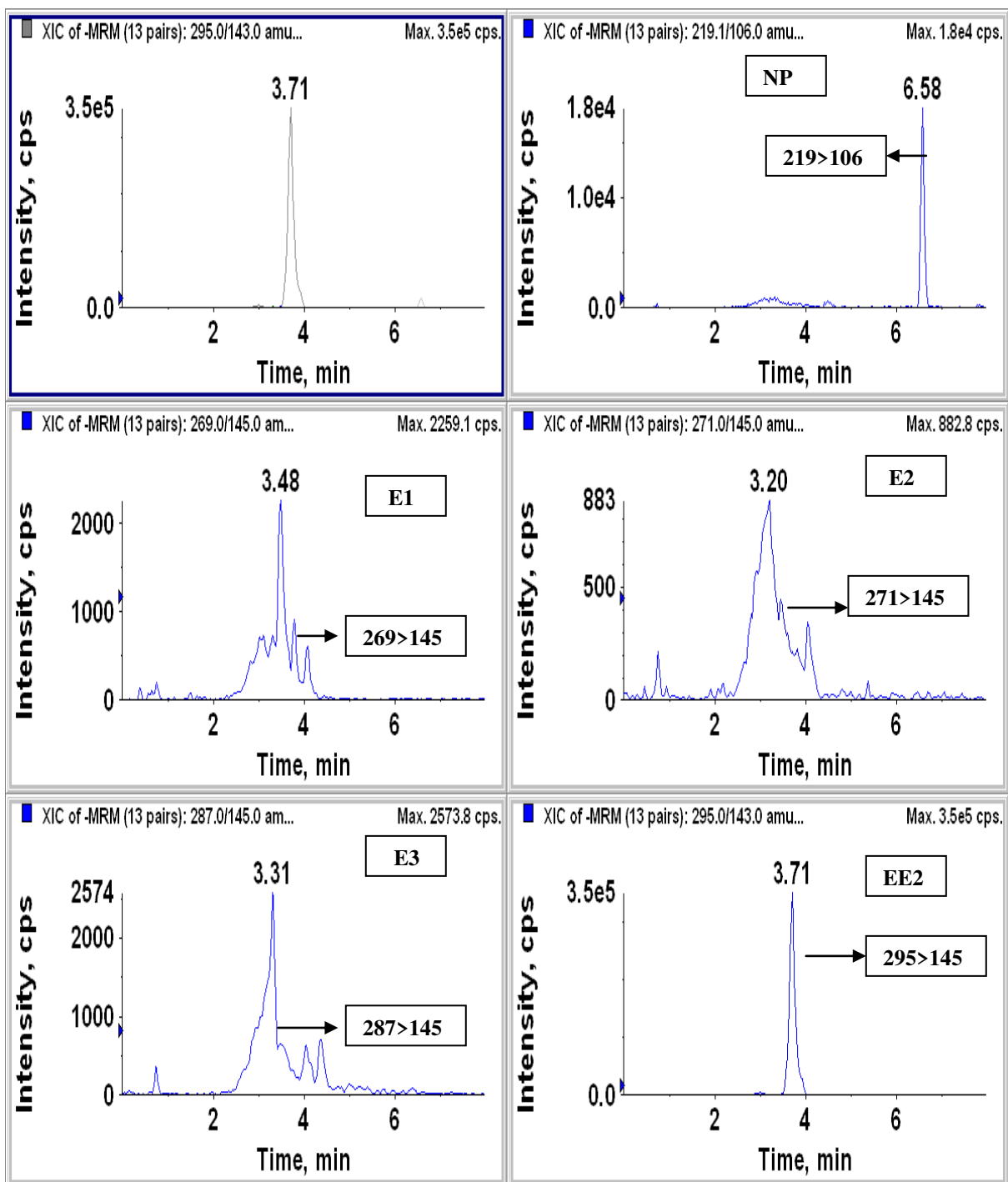


Figura 40.: Cromatogramas das amostras de água tratada de Campinas (coleta-14/08/07)

Nas amostras de água bruta e tratada da ETA de Sumaré, também foram detectados todos os DE objeto deste estudo, os cromatogramas são mostrados na figuras 41 e 42.

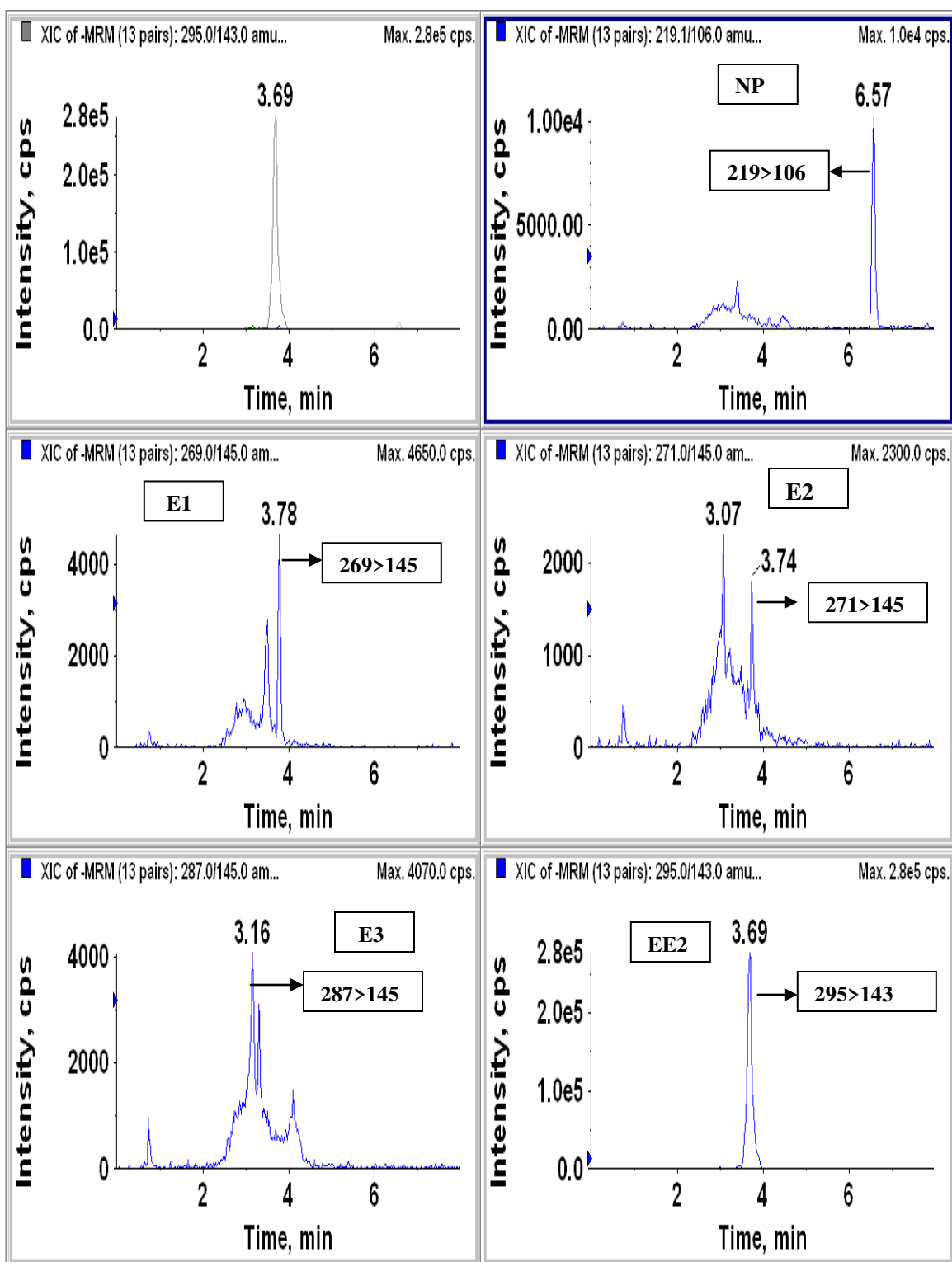


Figura 41: Cromatogramas das amostras da água bruta da ETA de Sumaré (coleta- 14/08/07).

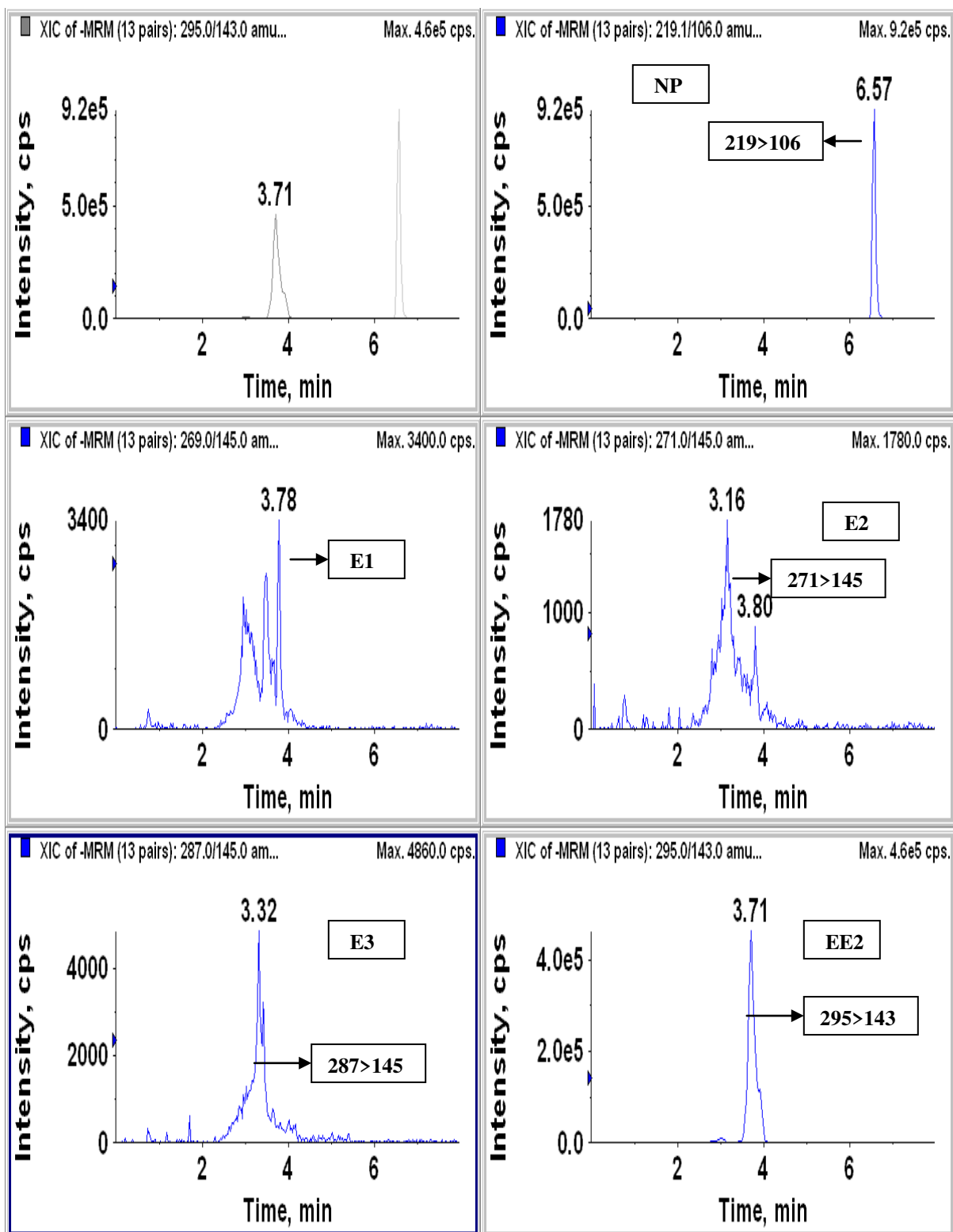


Figura 42: Cromatogramas das amostras da água tratada da ETA de Sumaré (14/08/07)

Os resultados das análises das amostras coletadas em 27/08/07 e 03/09/07 mostram a presença de E1, E2, E3 e de NP, na água bruta e tratada. Entretanto, pode-se observar que os cromatogramas não apresentam o íon produto que caracteriza a presença de EE2 (pico característico das transições típicas com tempo de retenção 3,69 min). A presença de um íon produto não típico (com tempo de retenção 3,99) mostra um provável isômero do EE2, mas por falta de material disponível não foi possível fazer um estudo para identificar tal composto. Todos os cromatogramas obtidos neste trabalho podem ser vistos no Anexo.

Os resultados das amostras coletadas em duplicata das ETAs de Campinas e Sumaré estão sumarizados na tabela 18. A presença de E1 na amostra de água bruta (Campinas e Sumaré) foi detectada em concentrações entre 0,15 e 11,6 ng/L. Este resultado é similar aos obtidos por XIÃO *et al.* (2001), em amostras de águas de superfície (0,2 a 8,5 ng/L), SHURE *et al* (2003), (2,3 ng/L) e TERMES *et al* (1999) (0,7 a 1,6 ng/L), na Alemanha. KOLPIN *et al* (2002) em rios dos EUA observaram uma concentração média de 27ng/L. Estudos realizados recentemente por GHISELLI (2006) mostraram concentração muito maiores em água da região de Campinas, sendo de 3,5 µg/L (Ribeirão Anhumas) e 5,0 µg/L (Ribeirão Pinheiros), nas águas do Rio Atibaia e captação da ETA-3 e ETA-4, o composto E1 esteve-se abaixo do limite de detecção. As amostras da água tratada mostram concentrações muito baixas de E1, sendo que em duas amostras de água da ETA de Campinas ele foi detectado (cromatogramas mostra picos característicos da transição 269>145), mas não quantificado por estar abaixo do limite de quantificação (ver tabela 18). Observa-se ainda que o tratamento removeu de 70 a 99% desses micropoluentes.

O E2, um hormônio de alta potência estrogênica, foi detectado em todas as amostras de água analisadas. As concentrações nas amostras de água bruta estiveram entre 3,00 e 9,07 ng/L.e da água tratada 0,78 a 1,48 ng/L. Outras investigações realizadas mostram resultados similares, os de SNYDER *et al* (1999) e KOLPIN *et al* (2002), que obtiveram concentrações entre 0,2 e 9,0 ng/L em água de superfície dos EUA e os de XIÃO *et al* (2001) que detectaram concentrações entre 0,5 e 7,0 ng/L nas águas de rios ingleses. Já, estudos em águas de superfície na Alemanha mostraram uma maior concentração de E2 em alguns pontos de: 0,2 a 29 ng/L (SHURE *et al*, 2003), e 0,2 a 2,1 ng/L.em água tratada(KUCH *et al*); porém,

GHISELLI (2006) obteve concentrações mais elevadas ainda 2,38 a 6,0 µg/L entretanto a autora afirmou que o procedimento adotado para a determinação das concentrações não era totalmente efetivo para intervalos restritos (ng/L).

Tabela 18: Concentrações média (ng L⁻¹) dos DE obtidas para águas das ETAs estudadas.

DE	Data da coleta	Campinas		Sumaré	
		Água bruta	Água tratada	Água bruta	Água tratada
E1	14/08/07	2,53	<LOQ	0,37	0,07
	27/08/07	11,6	0,10	0,54	0,07
	03/09/07	0,15	<LOQ	0,33	0,10
E2	14/08/07	9,07	1,05	7,27	1,45
	27/08/07	3,00	0,78	5,25	1,48
	03/09/07	4,31	0,95	6,66	1,02
E3	14/08/07	3,93	1,24	5,16	1,48
	27/08/07	3,23	0,43	6,10	1,80
	03/09/07	3,00	0,53	1,09	2,05
EE2	14/08/07	444	275	798	472
	27/08/07	nd	nd	nd	nd
	03/09/07	nd	nd	nd	nd
NP	14/08/07	228	15,2	29	87
	27/08/07	3,7	1,35	9,01	4,0
	03/09/07	17,05	2,89	3,34	11,85

LOQ limite de quantificação= 0,03ng/L para E1; nd= não detectado

As amostras de água bruta estudadas revelaram a presença de estriol em concentrações de até 6,1 ng/L. Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados (SHURE *et al*, 2003, XIÃO *et al*, 2001), que obtiveram concentrações de 1,3 a 3,0 ng/L, e KOLPIN *et al* (2002) que detectaram em média de 19 ng/L em seus estudos nos EUA.

No presente trabalho o hormônio sintético EE2 só foi detectado nas amostras de águas brutas e tratadas coletadas em 14/08/07, em uma concentração mais alta do que os demais DEs em estudo. Outros estudos em água de superfície mostram diferentes concentrações, tais como: 73 ng/L (KOLPIN *et al*, 2002), 15 ng/L (TERMES *et al.*, 1999) 0,2 a 0,5ng/L (SNYDER *et al.*, 1999) e 1,2 a 1,7µg/L. (GHISELLE, 2006).

Uma possível causa de não ter sido detectado EE2 nas amostras de 27/08/07 e 03/09/07 é que elas foram simples. Entretanto por não ter disponibilidade de tempo e recursos não foi possível verificar essa hipótese. A tabela 19 apresenta os resultados de todas as amostras analisadas.

Tabela 19: Concentrações (ng/l) dos DE nas duplicatas

Data das coletas	Amostras das ETAs	E1	E2	E3	EE2	NP
14/08/07	CB1	2,15	9	3,60	456	338
14/08/07	CB2	2,91	9,14	4,26	432	118
14/08/07	CT1	<LOQ	1,05	1,24	275	15,2
14/08/07	SB1	0,31	6,61	6,97	805	32
14/08/07	SB2	0,43	7,92	3,35	792	26
14/08/07	ST1	0,06	1,48	1,52	461	82
14/08/07	ST2	0,05	1,42	1,44	484	92
27/08/07	CB1	11,4	3,64	4,49	nd	3,5
27/08/07	CB2	11,8	2,35	1,96	nd	3,8
27/08/07	CT1	0,11	0,82	0,44	nd	1,78
27/08/07	CT2	0,09	0,75	0,42	nd	0,93
27/08/07	SB1	0,58	5,55	6,94	nd	8,57
27/08/07	SB2	0,5	4,95	5,2	nd	9,46
27/08/07	ST1	0,07	1,25	1,37	nd	4,4
27/08/07	ST2	0,06	1,71	2,23	nd	3,6
03/09/07	CB1	0,14	5,1	3,88	nd	15,2
03/09/07	CB2	0,17	3,52	2,1	nd	18,9
03/09/07	CT1	<LOQ	0,81	0,48	nd	3,07
03/09/07	CT2	<LOQ	1,08	0,59	nd	2,71
03/09/07	SB1	0,44	6,59	1,02	nd	3,37
03/09/07	SB2	0,21	6,63	1,16	nd	3,3
03/09/07	ST1	0,1	1,13	2,05	nd	12,68
03/09/07	ST2	0,11	0,91	2,04	nd	11,02

CB= Campinas bruta e CT=Campinas tratada; SB= Sumaré bruta e ST= Sumaré tratada; nd = não detectada

Os resultados de E3 e NP, obtidos nas amostras de Sumaré mostraram-se diferentes do esperado, pois as concentrações na água bruta das amostras coletadas em 3/09/07 apresentaram-se menores do que as de água tratada (tabela 19). Segundo OEHME *et al* (2002), quando se trabalha em nível de traço, há considerável risco de contaminação e erros sistemáticos causados pela adsorção, contaminação, reações de superfície e outros interferentes. Linhas de transferência e processos de ionização também podem causar erros sistemáticos. Todo procedimento analítico foi realizado com muito cuidado as vidrarias foram lavadas três vezes com detergente, o último enxágüe foi feito sete vezes com água de torneira, quatro vezes com água destilada e mais uma vez com metanol (grau HPLC). A água destilada não estava contaminada, pois ela foi utilizada para fortificação e apresentou recuperação de 78%. A coluna ou o bico de injeção do cromatógrafo também não estavam contaminados, pois os cromatogramas do nonilfenol não apresentaram base do pico do íon de transição larga. Os cartuchos utilizados foram novos e de marcas confiáveis. Entretanto, o resultado obtido neste estudo indica contaminação, provavelmente pela pipeta.

Nas amostras coletadas em Campinas, o nonilfenol foi detectado em concentração variada nas amostras de água bruta (17,05; 36,5 e 228 ng/L), como mostra a tabela 19. Investigações têm mostrado concentração de 0,1 a 3,7 µg/L em água de superfície (KOLPIM *et al* 2002; JOHNSON *et al* 2003; DING *et al*, 2001 e SNYDER *et al*, 1999). No estudo realizado por GHISELLI (2006), em águas do rio Atibaia, o nonilfenol estava abaixo do limite de detecção (1,5 µg/L).

Os resultados obtidos para as amostras de água do Rio Atibaia (água bruta das ETAs de Campinas e Sumaré) revelaram que as mesmas podem causar impacto em peixes, pois estudos tem mostrado que a concentração tóxica para estes organismos, dependendo da espécie, varia de 0,1 a 488 ng/L para o EE2 (HUTCHINSIN *et al*, 2005); de 1 a 10 ng/L para o E2 (ROUTHLEDGE *et al*., 1998; FOLMAR *et al*., 2000); de 10 a 50 ng/L para o E1 (DESBROW *et al*., 1998, BILA *et al*., 2003) e de 8,3 a 85 µg/L para o NP (ROUTHLEDGE *et al*, 1998, HARRIS *et al*., 1997).

5.3. Avaliação da remoção dos DEs nas ETAs de Campinas e Sumaré

O local das coletas na ETA, o tratamento das amostras e o esquema de tratamento nas ETAs estão descritos no capítulo anterior. Ressalta-se que as amostras de água bruta foram coletadas antes do ponto de pré-cloração e as de água tratada, na saída do tanque de contato, isto é, após a desinfecção final.

A tabela 20 mostra as dosagens dos produtos utilizados durante o tratamento nas ETAs no período em que foram realizadas as coletas. No tratamento de Campinas, não foi usada cal para correção do pH, como é feito no tratamento de Sumaré, uma vez que o coagulante (cloreto de polialumínio, PAC) não necessita de correção do valor de pH. Outra diferença no processo de tratamento é que a SANASA utiliza amônia anidra para fixar o cloro residual.

Tabela 20: Condições de operação das ETA estudadas no período das coletas

Condições de operação	ETA Campinas (SANASA)			ETA Sumaré (DAE)		
	14/08 às 10.00 h	27/08 às 10.00 h	03/09 às 9.00 h	14/08 às 9.00 h	27/08 às 12.15h	03/09 às 10.45h
Vazão (L/s)	2453	2883	2720	440	440	430
pH	6,9	6,9	7,0	6,3	6,3	6,6
Gás cloro (mg/L)	9,4	12,2	10	23,67	10,5	11,0
Cal - CaO. (mg/L)	18	15	16	–	–	–
Cal anidro - Ca(OH) ₂	–	–	–	32,5	32,5	19,7
Sulfato de alumínio (mg/L)	–	–	–	57,9	57,9	52
PAC (mg/L)	56	44	55	-	–	
Cal- pós (mg/L)	–	–	–	7,5	7,5	5,0
Pós-cloração(mg/L)	1,9	2,2	3,3	-	-	
Amônia (mg/L)	1,2	1,6	1,8	-	-	
Acido Fluossilícico (mg/L)	0,74	0,73	0,71	0,7	0,7	0,7
Cloro residual (mg/L)	3,3	3,9	3,3	2,5	4,0	4,5
pH - água tratada	7,2	7,0	7,2	7,2	7,0	7,1

Observa-se que os tratamentos de ambas as estações são bastante similares, assim como os resultados obtidos. Os parâmetros de pH, turbidez e condutividade da água bruta de Sumaré e Campinas são dados na tabela 21.

Tabela 21: Alguns parâmetros da água bruta coletada

Local	Data	Hora	pH	Turbidez	Condutividade
ETA Campinas	14/08/07	10,00	6.9	37	-
ETA Sumaré	14/08/07	9,00	6,6	13	0,23
ETA Campinas	27/08/07	10.00	6.9	17	-
ETA Sumaré	27/08/07	12,15	7,2	12	0,48
ETA Campinas	03/09/07	9,00	7,0	22	-
ETA Sumaré	03/09/07	10.45	7.1	11	0.5

A tabela 22 apresenta a eficiência de remoção para cada amostra coletada nas ETAs. O E1 foi o DE de menor concentração encontrado nas águas analisadas e com maior remoção, 99% para ETA de Campinas e 79% para ETA de Sumaré, seguindo-se o E2, com eficiência de remoção de 79% em ambas estações. O tratamento mostrou ser eficiente também na remoção de E3 nas duas ETAs. O NP foi removido com eficiência de 82% na ETA de Campinas. Já em Sumaré, este valor foi de 55%. Entretanto, este é o resultado de uma só amostra (duplicata). Para EE2, a remoção nas estações de tratamento foi em torno de 40 % .

Coagulação, floculação, sedimentação e filtração geralmente não removem totalmente os compostos orgânicos em nível de traços; a remoção obtida nas estações de tratamento, provavelmente, deve-se à oxidação com cloro.

Os resultados estão em conformidade com estudos recentes (WESTERHOFF *et al*, 2005, CHOI *et al*, 2006), realizados em escala piloto, para verificar a remoção destes DE na água, os quais mostram que E1, E2, E3, EE2 e NP oxidam facilmente (90%), devido à presença de grupos hidroxílicos ligados ao anel aromático.

Estudos em laboratório têm revelado que a oxidação com cloro transforma os DE em compostos clorados (HU *et al*, 2003, LEE *et al*, 2004), que podem ter alta atividade estrogênica. O E2 em solução aquosa pode formar E2 monoclorado, E2 diclorado, E1 monoclorado e E1 diclorado, com atividade estrogênica que pode ser igual ou maior que estrona. Outra investigação mostra que a cloração em água natural pode aumentar 2 ou 3 vezes mais a atividade estrogênica do que o NP e E2 (ITCH *et al*, 2000). Portanto, a cloração pode gerar produtos mais tóxicos e mais persistentes, por isso é recomendada a remoção dos DE antes da cloração.

Tabela 22: Resultado das concentrações e remoções dos DE estudados (ng/L)

DE	Data da coleta	ETA de Campinas			ETA de Sumaré		
		Água bruta	Água tratada	Remoção	Água bruta	Água tratada	Remoção
E1	14/08/07	2,53± 0,5	<LOQ	-	0,37± 0,08	0,07±0,007	81%
	27/08/07	11,6 ± 0,3	0,10 ± 0,01	99%	0,54± 0,05	0,07± 0,007	87%
	03/09/07	0,15± 0,02	<LOQ	-	0,33± 0,1	0,10± 0,007	70%
E2	14/08/07	9,07 ± 0,9	1,05± 0,04	88%	7,27± 0,9	1,45± 0,04	80%
	27/08/07	3,00 ± 0,3	0,78 ± 0,04	74%	5,25 ± 0,4	1,48± 0,3	72%
	03/09/07	4,31± 0,02	0,95 ± 0,2	77%	6,66 ± 0,3	1,02± 0,1	84%
E3	14/08/07	3,93 ± 0,4	1,24 ± 0,04	68%	5,16 ± 2	1,44± 0,05	59%
	27/08/07	3,23 ± 1	0,34 ± 0,01	89%	6,10± 1	1,80± 0,5	70%
	03/09/07	3,00 ± 1	0,53 ± 0,07	82%	1,09 ± 0,09	2,05± 0,007	
EE2	14/08/07	444 ± 16	275±16	38%	786 ± 9	472 ± 9	42%
	27/08/07	nd	nd	-	nd	nd	-
	03/09/07	nd	nd	-	nd	nd	-
NP	14/08/07	228 ± 155	15,2 ± 11	93%	29 ± 4	87 ± 7	
	27/08/07	3,65± 0,2	1,35 ± 0,5	63%	9,01± 0,6	4,0 ± 0,5	55 %
	03/09/07	17,05 ± 2	2,89 ± 0,2	83%	3,34 ± 0,04	11,85± 0,7	

nd= não detectado; LOQ = limite de quantificação: 0,03 ng/L

Os resultados da média das remoções dos DE da água tratada nas ETAs de Campinas e de Sumaré são mostrados na tabela 23, e indicam a eficiência do tratamento para remoção dos DE em ambas estações. Embora os resultados do presente estudo indiquem que as ETAs de Campinas e de Sumaré operam de forma eficiente para remoção da maioria dos DE estudados, ainda restam traços que podem ser significantes na água tratada.

Tabela 23: Média das concentrações e remoções dos DEs da água

DE	Remoção Média (%)		Concentração média (ng/L) resultante na água tratada	
	Campinas	Sumaré	Campinas	Sumaré
E1	99	79	0,03	0,06
E2	79	79	0,92	1,32
E3	79	65	0,70	0,62
EE2	38	40	275	472
NP	82	55	6,14	4,0

Os estrógenos esteróides (E1,E2,EE2) tem um potencial para exercer efeitos estrogênicos em nível de 1ng/L. Já, o nonilfenol é estrogênico em concentração da ordem de µg/L (ROUTHLEDGE *et al*, 1998). O E1, E2 e EE2 possuem uma alta potência estrogênica enquanto que o NP e o E3, estrogenicidade fraca (SCHAFER *et al.*, 2003, JOHNSON *et al.*, 2001). Portanto, a concentração remanescente de DE na água distribuída nas cidades de Campinas e Sumaré é estrogênica. Somando-se isto ao fato de que os subprodutos da cloração eventualmente formados também são estrogênicos, além de que muitos outros compostos com atividade estrogênica podem estar presentes nestas águas, é primordial uma investigação mais detalhada sobre este assunto.

O meio científico tem questionado se a presença desses DE na água potável, em baixas concentrações, pode afetar o desenvolvimento, a diferenciação e a reprodução sexual do homem (OEHTMANN et al, 2006; HANSELMAN et al, 2003), causando também um impacto à saúde, assim como aos peixes e animais silvestres, entretanto devido a complexidade do sistema endócrino (muitos são os fatores que podem perturbá-lo), ainda não se tem estudos conclusivos sobre toxicidade e risco da exposição humana a esses hormônios ambientais.

Segundo JOHNSON *et al* (2001), os estrógenos esteróides e os estrógenos alquilfenol podem ter efeitos aditivos e é possível prever a atividade estrogênica de um efluente de ETE. Fazendo uma projeção para água tratada, utilizado o E2eq (equivalente a E2), pode-se fazer uma previsão da provável atividade estrogênica da água produzida nas ETA estudadas, como mostra a tabela 24.

Tabela 24: Estimativa da atividade estrogênica da água tratada nas ETA estudadas.

DE	E2 eq <i>in vitro</i>	Concentração ETA Campinas	Concentração prevista <i>in vitro</i> em ng/LE2eq para ETA de Campinas	Concentração ETA Sumaré	Concentração prevista <i>in vitro</i> em ng/LE2eq para ETA de Sumaré
E1	0,5	0,03	0,15	0,06	0,03
E2	1	0,92	0,92	1,32	1,32
E3	0,005	0,70	0,0035	0,62	0,003
EE2	1-2	275	275	472	472
NP	0,001	6,24	0,0062	4,0	0,004
Total			276,079		473,357

A atividade estrogênica prevista para ETA de Campinas mostra que os DEs presentes na água tratada equivalem a 276,079 ng/L de E2 e de Sumaré, a 473 ng/L de E2 (altamente estrogênica). Entretanto, se não for adicionada a concentração prevista *in vitro* para EE2 (pois só foi detectado em uma das amostras), a atividade estrogênica prevista equivalente seria 1,079ng/L de E2 para ETA de Campinas e 1,357 ng/L de E2 para ETA de Sumaré. Portanto, as água tratadas em estudo podem ser consideradas estrogênicas, já que compostos como estes podem estar ativos no sangue humano em concentrações tão baixas como 0,5 ng/L (SCHÄFER *et al*, 2003).

O efeito potencial à saúde humana associado ao longo tempo de ingestão de baixas concentrações de DE na água potável ainda é pouco conhecido. Além do mais, os critérios utilizados para água tratada são baseados na toxicidade dos compostos individuais e não na combinação dos mesmos. Só recentemente, pesquisas têm estudado a possibilidade de efeitos sinérgicos da exposição a múltiplos compostos orgânicos, mesmo em baixa concentração (STACKELBERG *et al*, 2004).

Estudos revelam que DE e outros compostos orgânicos são encontrados na água após o processo de tratamento. A pesquisa feita pela Inspeção Geológica e pelo Centro de Controle e Vigilância de Doenças dos EUA (STACK STACKELBERG *et al*, 2004), mostraram que 40 compostos orgânicos (fármacos e DE) persistem em água após o tratamento (CAP, desinfecção, floculação, sedimentação, filtração).

KIM *et al* (2007), no primeiro estudo descrito na literatura de ocorrência e remoção DEs em águas de superfície e tratada na Korea do Sul, identificaram 18 compostos (fármacos e DEs) na água de superfície, apenas o E3 foi detectado (1,7-5,0 ng/L) e na água tratado esteve abaixo do limite de detecção (1,0 ng/L⁻¹). A remoção dos 6 compostos detectados na água tratada (diferentes dos estudados nesse trabalho) foi atribuída ao uso do CAG no tratamento.

WESTERHOFF *et al*. (2005), em estudos de remoção de DE, fármacos e produtos de uso pessoal (62 compostos), mostraram que somente 10% dos compostos são oxidados

facilmente pelo cloro, enquanto a adição de 5mg/L de carvão ativado em pó com 4 horas de contato remove de 50% a > 98% dos compostos. Consideram, assim, a adição de CAP no processo de tratamento de água uma estratégia de custo relativamente baixo para remoção de prováveis DE, fármacos e produtos de uso pessoal. Entretanto, a US EPA avalia o CAG (carvão ativado granulado) como a melhor tecnologia para remoção de numerosos poluentes orgânicos.

No Brasil, o uso de unidades de CAG pós-filtração rápida não é feito, por implicar em construção ou reforma na ETA, além do custo operacional relativo a remoção e ou reposição do carvão após saturação. As ETAs localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí, como as deste estudo, utilizam esporadicamente CAP na água bruta, notadamente quando há ocorrência de odor e sabor, entretanto, a importância não deve ser dada somente ao gosto e ao sabor, haja visto, que compostos presentes na água tratada como DE estudados (e outros não estudados) não alteram a cor e nem o sabor e podem causar risco à saúde humana. O CAP deveria ser utilizado principalmente para remoção de compostos orgânicos presentes na água e que podem causar danos à saúde humana, como os DE estudados, embora ainda não sejam contemplados no padrão de potabilidade vigente. Mesmo que, pelo princípio da prevenção (com base nos resultados obtidos e nas indicações da literatura), recomenda-se a aplicação de carvão ativado quando o manancial receber aporte de esgoto *in natura* ou parcialmente tratado.

**“Eis que Jesus vem com as nuvens
e todo olho O verá”
Apocalipse 1:7**

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou a presença dos seguintes Disruptores Endócrinos (DEs): Estrona (E1), 17 β Estradiol (E2), Estriol (E3) , 17 α etinilestradiol (EE2) e Nonilfenol (NP) em água bruta (*in natura*, do Rio Atibaia) e água tratada pelas ETA 3 e 4 de Campinas e ETA 2 de Sumaré, Estado de São Paulo, utilizando o método de extração em fase sólida e análise por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa (CLAE- EM-EM). O método se mostrou efetivo para identificação e quantificação destes compostos.

Os resultados da análise mostraram a ocorrência de todos os hormônios sexuais naturais (E1,E2,E3), sintético (EE2) e o mimetizador hormonal (NP) nas águas de abastecimento público de Campinas e Sumaré. As concentrações (médias) obtidas para água tratada em Campinas e Sumaré foram, respectivamente, de 0,1 e 0,06 ng/L de E1, 0,93 e 1,30 ng/L de E2, 0,70 e 0,72 ng/L E3, 275 e 472 ng/L de EE2 e 6,14 e 4,0 ng/L de NP.

A atividade estrogênica prevista para água tratada na ETA de Campinas equivale a 276,079 ng/L de E2 e na ETA de Sumaré, 473 ng/L de E2, podendo ser consideradas altamente estrogênicas, já que E2 é um estrógeno muito potente.

O processo de tratamento utilizado em Campinas remove em média, mais do que 80% dos DE estudados, com exceção de EE2, cuja eficiência de remoção foi de 38%. Na ETA de Sumaré, a eficiência de remoção foi de 80% para E1 e E2, de 60% para E3 e NP e de 41% para EE2. Entretanto, não se avaliou a formação de subprodutos (com potencial estrogênico) a partir da cloração.

As concentrações dos DE obtidas nas captações revelam que as águas do rio Atibaia (manancial), baseado em dados da literatura, pode ser considerada tóxica para animais silvestres e, principalmente, para peixes e biota aquática.

6.1. RECOMENDAÇÕES

A presença de DEs na água de consumo humano deve servir de alerta para as autoridades e órgãos responsáveis pelo manejo de água em nível estadual e federal sobre o possível risco à saúde humana, devido à exposição prolongada a esses estrógenos, e muitos outros não contemplados neste estudo, como fármacos e produtos de uso pessoal já anteriormente detectados no mesmo Rio Atibaia.

Considerando-se que a oxidação por cloro tenha sido preponderante na remoção dos DEs estudados, com a probabilidade da formação de subprodutos potencialmente estrogênicos, são necessários mais estudos a fim de verificar a presença dos mesmos nestas águas.

Os disruptores endócrinos são micro-poluentes presentes na água tratada e ainda não fazem parte dos padrões de potabilidade estipulados pelo Ministério de Saúde no Brasil. Porém, medidas preventivas, tal como o uso de carvão ativado em pó, deveriam ser adotadas pelas companhias de saneamento para se remover esses e outros compostos orgânicos, os quais, ainda que não confirmem odor e sabor à água, muito pior, podem trazer sérios riscos à saúde humana.

Tendo em vista o pioneirismo deste trabalho na América Latina, bem como alguns resultados, o número, a frequência de coletas e a quantidade limitada de compostos examinados,, fica evidente a necessidade de novos estudos que venham continuar e ampliar as investigações sobre a ocorrência destes e de outros micropoluentes emergentes na água tratada e a eficiência de remoção dos diferentes processos de tratamento, mesmo que os mesmos ainda não sejam contemplados pela legislação ambiental vigente.

Os resultados obtidos para as amostras da águas do Rio Atibaia (água bruta das ETAs de Campinas e Sumaré) revelaram que as mesmas podem causar impacto em peixes e animais silvestres. Entretanto, estudos futuros são necessários para verificar essa hipótese.

Os mananciais situados em regiões de grande expansão demográfica como o rio Atibaia são diretamente impactados pelo lançamento de despejos de origem industrial, pelo escoamento superficial de áreas agrícolas e, principalmente, esgoto sanitário contendo micropoluentes, tais como os DEs estudados neste trabalho, portanto, faz-se vital e urgente um maior investimento em tratamento de esgoto nessa bacia hidrográfica

O uso de pipetas volumétricas mostrou resultado mais eficiente para a recuperação do que pipetas automáticas, que não estavam devidamente calibradas, portanto é necessário verificar a calibração das pipetas antes de usá-las, principalmente quando se trabalha a nível de traços .

“Então vi novos céus e nova terra, pois o primeiro céu e a primeira terra tinham passado e Deus enxugará dos seus olhos toda lágrima, não haverá mais morte, nem tristeza, nem choro nem dor” Apocalipse 21: 1-4

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); Resolução de RE n.899 de 29/05/2003.

ADANS N. R. Clover phyto-oestrogens in sheep in Western Australia. *Pure & Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1855– 1783, 186, 1998..

ALDA, M. J. L., BARCELÓ, D., Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 892, p. 391 – 406, 2000.

AULERIT, R. RINGER, R e IWAMOTO, S. Reproductive failure and mortality in mink fed on great lakes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 19, p. 365 – 376, 1973.

BARONTI, C., CURINI, R., D'ASCENZO, G., CORCIA, A. DI GENTILI, A., SAMPERI, R., Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Tecnology*, v. 34, n. 24, p. 5059-5066, 2000.

BECK, I. C., BRUHN, R., GANDRASS, J., RUCK, W. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of Baltic Sea. *Journal of Chromatography. A* ,v. 98, p1090-1098, 2005.

BELAND, P., PEGUISE, S., CIRARD, A. LAGACEE, A. MARTINEAU, D. MICHAUP, R., MUIR, D., NORSTROM, R. , PELLETIER, E., RAY, S. e SHUGART, L., Toxic compounds and health and reproductive effects in St Lawrence beluge whales. *Journal of Great Lakes Research*, v. 19, n. 4, p. 766 – 775, 1993. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.

- BELFROID, A. C., VAN DER HORST, A., VETHAAK, A. D., SCHFER, A. J., RIJS, G. B. J., WEGENER, J., COFINO, W. P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, n.225, p. 101-108, 1999.
- BENNETTS, H. UNDERWOOD, E. e SHIER, F. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western. Australian, *Veterinary Journal*. V. 22, p. 2 – 12, 1946. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.
- BERGERON, J. M., CREWS, P., McLACHLAN, J. A. PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, p. 780 – 781, 1994.
- BILA, D.M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v.26, 523-530, 2003.
- BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v.30, p.651-666, 2007.
- BINGHAM, S., Dietary phyto-oestrogens and cancer. *Pure & Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1777 – 1783, 1998.
- BITMAN, J. CECLI, H. C., HARRIS, S. J., FRIES, G. F. Estrogenic activity of o-p-DDT in mammalia uterus and avian oviduct. *Science* v. 162, p. 371 – 372, 1968.
- BOID, G.R., REEMTSMA, H., GRIMM, D.A., SIDDHARTHA, M. Pharmaceuticals and personal care products in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario. *Science of Total Environment*, v.311, p.135-149, 2003.

- BRAGA O., SMYTHE G. A. , SCHAFER N. J. e FEITZ J. Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology*, v. 39, p 3351-3358., 2005.
- BROOKS, A. N. Comparative physiology of the reproductive endocrine system in laboratory rodents and humans. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1633 – 1646, 1998.
- BROTONS, J., SERRANO O. M., VILLALOBOS, M., PEDRAZA, V. e OLEA, N. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environmental Health Perspectives*, v. 103, p. 608 – 612, 1995.
- BULL, J. J. Sex determination in reptiles. *O. Ver. Biol.* V. 55, p. 3 – 21, 1980.
- BURLINGTON, H., LINDEMAN, V. Effects of DDT and secondary sex characters of white leghorn cockerels. *Society for Experimental Biology and Medicine* v. 74, p. 48 – 51, 1976
Apud COLBORN et al. O futuro Roubado, 1997.
- CASTRO, C. M. B.de. Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida. *Engenharia sanitária e ambiental*, v.7, n 1, 2002.
- CETESB (2007) <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/ugrhis/u05.asp> , acessada em 12/2007
www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/monitoramento.asp, acessada 9/2/2007
- CESTESB (2006) Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo de 2006, www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/relatorios.asp. acessada em 22/12/07
- CHANG, S. , WAITE, T.D., SCHÄFER, A.I., FANE, A.G. Adsorption of the endocrine active compound estrone on microfiltration hollow fiber membranes. *Environmental Science & Technology*, v.37, p.3158– 3163, 2003.

- CHOI, K. J., KIM, S. G., KIM, C. W., PARK, J.K. Removal efficiencies of endocrine disrupting chemicals by coagulation/flocculation, ozonation, powdered/granular activated carbon, and chlorination . Korean J. Chem. Emg., v. 23, n.3, p.399-408, 2006.
- CIOLA REMULO. Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC. São Paulo, Edgard Büchner, 2000.
- COLBORN, T., DUMANOSKI, D. e MYERS, J. P. *O Futuro Roubado*. (tradução: Claudia Buchweitz) Porto Alegre. L&P. 354p, 1997.
- COLBORN, T. e CLEMENT, C. eds. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife human connection. *Princeton Scientific Publishing*, p. 289 – 283, 1992. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.
- COLLINS, C. H., BRAGA G.L., BONATO, P. S. Introdução á Métodos Cromatográficos *Editora da UNICAMP*, 1997.
- COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA), CAPIVARI E JUNDIAÍ (CBH – PCJ -2006). Plano de Bacia Hidrográfica 2000-2003 – Relatório Final – Fase 3. Plano de Bacia – COPLAENGE Projetos de Engenharia Ltda / FEHIDRO.
- DAE- Departamento de Água e Esgoto de Sumaré <http://www.daesumare.com.br/> . Retirado em 31/12/2007.
- DAVIS, D., BRADLOW, H., WOLFF, M., WOODRUFF, T., HOEL, D. e CULVER-ANTON, H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breasted cancer. *Environmental Health Perspectives*, v. 101, n. 5, p. 372 – 377, 1993.
- DESBROW, C. ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., SUMPTER, J. P. e WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in

vitro biological screening. *Environmental Science & Technology*, v. 32, n. 4, p. 1549 – 1558, 1998.

DING WANG-HSIEN e TZING SHIN-HAW. Analysis of nonylphenol polyethoxilates and their degradation products in river water and sewage effluent by gas chromatography-ion trap (tandem) mass spectrometry and electron impact and chemical ionization. *Journal of Chromatography*, v.824, p 79-90 2001

DING, Z., ZHU, H.Y.,GREEFILD, P.F., LU, G.Q. Characterization of pore structure and coordination of titanium an TiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ *Journal of colloid and interface science* v.267, p.262- 272, 2001 . Apud Eris L. A. 2002

DRASTICCHOVA, J., SVOBDOVA, Z., GROELAND, M., DOSBSIKOYVA, R., WEISSOVA, D., SZOTKWOSKSA, M.. Effect of exposure to bisphenol A and 17 beta-estradiol on sex differentiation in zebra fish (*Danio rerio*). *Acta Veterinaria* , v.74, p. 287-291, 2005.

ESPERANZA, M., SUIDAN, M.T., NISHINURA, F.,WANG, Z., ORIAL, G.A., ZAFFIRO,A., MACCAULEY, P., SAYLES,G. Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrices of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology*, v.38, p.3028 – 3035, 2004.

ERIS, L.A. Sistemas e fotocátalise como alternativa para o tratamento de efluentes industriais http://saturno.crea-rs.org.br/crea/pags/revista/38/CR38_area-tecnica-artigo5.pdf.

Retirado em 29/11/2007 às 17 h.

EUROPEAN COMISSION in: European workshop on the impact of endocrine disrupters in human health and wildlife; Report of the Proceedings, 2 – 4, December 1996. Weybridge, VK, 1996 – Report EUR. 17549. Apud Alda, M. J. L, et.al, *Journal of Chromatography A*, v. 892, p. 391-406, 2000.

- FERRERO-DIAZ, J., RODRIGUES-LARENA, M. C., COMELLAS, L., JIMÉNEZ, B. Bioanalytical methods applied to endocrine disrupting polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. A review. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 16, n. 10, 1997.
- FENDINGER, N.J., BEGLEY, W.M., McAVOY, D.C., ECKHOLF, W.S. *Environmental Science & Technology*, v.26, p.24931 – 2498, 1992.
- FERGUSON, P. L., IDEN, C. R., BROWNAWELL, B. J. Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, vol. 72, n.18, p. 4322-4330, 2001.
- FIELD, J.A., REED, R.L. Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of nonionic surfactants in U.S. paper mill effluents, municipal sewage treatment plant effluents, and river waters. *Environmental Science & Technology*, v.30, p.3544 – 3550, 1996.
- FORTER, W., CHAN, S., PLATT, L., HUGHES, C. Detection of endocrine disrupting chemicals in samples of record trimester human amniotic fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.85, n.8, p. 2954 – 2957, 2000.
- FOLMAR, L.C., HEMMER, M., HERMMER, R., BOWMAN, C. DENSLOW, N.D. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol, and diethylestilbestrol in an in vivo male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*), vitellogenin bioassay. *Aquat. Toxicol.* V49, p. 77-88, 2000.
- FÜRHACKER, M. Endocrine disrupters in the aquatic environment: The Austrian approach – ARCEM. International Water Association. Home page: workshop on endocrine disruptors 7 – 12 April 2002. www.iwahq.org.uk//template.cfm?name=edworkshop.

- GIBSON R., SMITH M. D., SPARY C. J., TYLER C. R. , HILL E. M. Mixtures of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents. *Environmental Science & Technology*, v.39, p.2461 – 2471, 2005.
- GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das água destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação de interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). *Tese de doutorado*. UNICAMP. Instituto de Química. 27 setembro 2006.
- GORE,A.C., WU,T.J., OUNG, T., LEE, J.B.,WOLLER, M.J. A novel mechanism for endocrine-disrupting of polychlorinated biphenyls: direct effects on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology*, v.14, p. 814-823, 2002
- GREENE R., BURRILL M. e IVY. A. Experimental Intersexuality: the paradoxical effects of estrogens on the sexual development of the female rat. *Anatomical Record* v. 94, n.4, p. 429 – 38, 1939a. Apud COLBORN *et al.* O futuro roubado, 1997.
- GREENE R., BURRILL, M. e IVI, A. Modification of sexual development of the white rat with a synthetic estrogen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology e Medicine*, v. 41, p. 169 – 170, 1939b. Apud COLBORN et al. *O futuro roubado*, 1997.
- GUILLETTE, L., GROSS, T., MASSON, G. R., MATTER, J. M., PERCIVAL, H. F., WOODWARD, A. R.. Development abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida *Environmental Health Perspective*, v. 102, p. 680 – 688, 1994.
- GUILLETTE, L., GROSS, T., GROSS D., ROONEY, A. A., PERCIVAL, H. Gonadal steroid genesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. *Environmental Health Perspectives*. v. 103, p. 31 – 36, 1995.

- GUYTON, A. C.T *Tratado de Fisiologia Humana*—Rio de Janeiro – Guanabara, 6 ed., p. 844, 1996.
- GUZELIAN P. Fourteen workers exposed to pesticide kepon are probably sterile, researchers report. *Occupational Health and Letters* v. 6, n. 2, 1976. Apud COLBORN et al. *O futuro roubado*, 1997.
- HANSELMAN,T.A.,GRAETZ, D.A., WILKIE, A.C. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review. *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 24, p. 5471 – 5478, 2003.
- HARRIS, J. E., SHEAHAN, D. A., JOBLING, S., MATTHIESSEN, P., NEALL, P., ROUTLEDGE, E. J., RYCROFT, R., SUMPTER, J. P. e TYLOR, T. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 11, p. 1993 – 2002, 1996.
- HARRIS, J. E., SHEAHAN, D. A., JOBLING, S., MATTHIESSEN, P., NEALL, P., SUMPTER, J. P. TYLOR, T. e ZANAM, N. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenises in caged male trout *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16, n. 3, p. 534 – 342, 1997.
- HERBST, A., ULFELDER, H. e POSKANZER Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal estilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England of Medicine*, v. 284, p. 878 – 881, 1971. Apud COLBORN et al. *O futuro roubado*. RS L&PM. 1997.
- HOLBROOK,D.R. Sorption of 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinylestradiol by Colloidal Organic Carbon Derived from Biological Wastewater treatment Systems *Environmental Science & Technology*, v. 38, n. 12, p. 3322-3329, 2004.

- HYLLAND, K., HAUX, C. Effects of environmental estrogens on marine fish species. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 16, n. 10, 1997.
- HU, J., CHENG, S., TERAQ, Y., KUNIKANE, S. Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities. *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 17, p. 5665 – 5670, 2003.
- HUTCHINSON, T. H., MANKIEY, G.T., SEGNER, H., TYLER, C.R. Screening and Testing for Endocrine Disruption in Fish-Biomarkers As "Signposts", Not "Traffic Lights," in Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, v. 114 n. S-1, 2006. <http://ehponline.org/members/2005/8062.html> Retirado 23/04/2007.
- ITCH, S., UEDA, H., NAASAKA, T., NAKANISHI, G., SUMITOMO, H. Evaluating variation of estrogenic effect by drinking water chlorination with the MVLN assay, *Water Sci & Tech*, v. 42, p. 61. 2000.
- JOBLING, S. Review of suggested testing methods for endocrine-disrupting chemicals *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, 1805 – 1827, 1998.
- JOBLING, S. NOLAN, M., TYLER, C. R. E SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*, v. 32, n. 17, p. 2498 – 2506, 1998.
- JOBLING, S., e SUMPTER, J. J. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout. (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic toxicology*, v. 27, p. 361 – 372, 1993.
- JOHNSON, A.C., BELFROID A., DI CORCIA, A. Estimating steroid inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *The Science of the Total Environment*, n. 256, p. 163-173, 2000.

- JOHNSON, A.C., SUMPTER, J.P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science & Technology* v.45, n.24, p.4697-4703, 2001
- JOHNSON, Andrew e JÜRGENS, Monika. Endocrine active industrial chemicals; Release and occurrence in the environment. *Pure Applied an Chemistry*. V.75, p.1895-1904, 2003.
- JONKERS, N., KNEPPER T. P., VOOGT, P. Aerobic biodegradation of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, v. 35, n. 2, p. 335 – 340, 2001.
- JUNIOR, H, A, M, BUSTILLOS, O. V., LEBRE, D., WANG, A. Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massa "Tandem" (CLAE-EM/EM). *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 586-592, 2006.
- KELLY CAROLE. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.872, p.309-314, 2000.
- KIM, S.D., CHO, J., KIM, I.S., VANDERFOD, J., SNYDER, S. A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disrupter in South Korean surface, drinking, and waste water. *Water Research*, v. 41, p. 1013-1021. 2007. retirado de [www:/sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL_u di=B6v73-4KPX8P7-1&_](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL_u di=B6v73-4KPX8P7-1&_)
- KNACKER, T. European Union research project: *POSEIDON – environmental risk assessment*. International Water Association. Home page: workshop on endocrine disruptors 7 – 12 de abril 2002. www.iwahq.org.uk//template.cfm?name=edworkshop. Retirado em 25/06/02.

- KOIFMAN S, KOIFMAN RJ, MEYER A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Obstet gynaecol Br commonw* , v 81, p. 849-855, 1974.
- KRAAK, G. V. D., Observation of endocrine effects in wildlife with evidence of their causation. *Pure & Applied Chemistry*, v.70, n. 9. p. 1785 – 1794, 1998.
- KRISHNAM, A., STATHIS, P., PENNUTH, S. TOKES, L., FELDMAN, D. Bisphenol – A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, v. 132, p. 2279 – 2286, 1993.
- KOBAYASHI, K.; TAMUTSU, S.; YASUDA, K.; OISHI. T; Vitellogenin-immunohistochemistry in the liver and the testis of the medaka, *Oryzias latipes*, exposed to 17 β -estradiol and p-nonylphenol. *Zoological Science* , v.22,p.453-461, 2005.
- KOBUKE, Y., TANAKA, H., MAGARA, Y., Research in Japan: Nationwide and regional river monitoring studies as well as bioassays and treatment of EDs in waterworks. International Water Association. *Home page: workshop on endocrine disruptors* 7 – 12 de abril 2002. www.iwahq.org.uk//template.cfm?name=edworkshop retirado em 24/09/2007.
- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B., BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S Streams, 1999 – 2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, vol. 36, n. 6, p. 1202 – 1211, 2002.
- KÖRNER, W.; BOLZ, U.; SÜBMUTH, W.; HILLER, G. G.; SCHULLER, W.; HANF, V.; HAGENMAIER, H.; *Chemosphere* v. 40, p.1131, 2000.
- KUCH, H. M. e BALLSCHMITER, K., Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRCG-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science & Technology*, v.35, p. 3201-3206,2001.

- KUMAR, S.K., KANNAN, K, SUNDARAM, V.P.S., NAKANISHI, J. MASUNAGA, S., Polychlorinated dibenzo-O-dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in human tissues, meat, fish, and wildlife samples from India. *Environmental Science & Technology*, v.35, p.3448-3455, 2001.
- LANÇAS, F.M. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. S.Carlos. Rima editora, p93, 2004.
- LAGANÀ, A. *et al* (2000.)Apud XIAO, X. Y., McCALLEG, D. V., Mc EVOY, J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography – negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, v. 923, p. 195-204, 2001.
- LÄNGE, R., HUTCHINSON, T H., CROUDACE, C. P., SIEGMUND, F., SCHWEINFURTH, HAMPE, P., HAMPER, P., PANTER, G.H., SUMPTER, J.P. Effects of the synthetic estrogens 17 α ethinylestradiol on the life cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology Chemistry*, v.20, 1216-1227, 2001.
- LEE, B.C., KAMATA, M., AKATSUCA, Y., TAKEDA, M., OHNO, K., KAMEI, T., MAGARA, Y. Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Resources*. v.38, p. 733-739, 2004.
- LI, J.J. e LI, S. A.. Breast cancer: evidence for xeno-oestrogens involvement in its incidence and risk. *Pure & Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1713 – 1723, 1998.
- LIEHR, J. G., SOMASUNDERAM, A., e ROY, D. Metabolism and fate of xeno-oestrogens in man. *Pure & Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1747 – 1758, 1998.
- LIND, P.M., MILNES, M.R., LUNDBERG, R., BERMUDEZ, D., ÖRBERG, J., GUILLETTE, L.J.Jr. Abnormal bone composition in female juvenile American alligators

- from a pesticide-polluted Lake (Lake Apopka, Florida). *Environmental Health Perspectives*, v.112,n.3, p. 359-362, 2004 .
- LINTELMANN, J.,KATAYAMA, A., KUNIHARA.N. SHORE,L.,WENZEL.A. Endocrine Disrupter in the Environment. *Pure & Applied Chemistry*, v.75,p.631-681, 2003.
- MARISHENG, SASSOON, DAVID A. PCBs exert an estrogenic effect through repression of the Wnt7a signaling pathway in the female reproductive tract. *Environmental Health Perspectives*, v.114, n.6, 2006.
- MARTINEAU, D., BELAND, R., DEJARDINS, C. e LAGACEE, A. Levels of Organo Chorenne Chemical in tissue of beluga whales (*Delpinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *Actives of Environmental Contamination and Toxicology*, v, 16, p. 137 – 147, 1987. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.
- MASON, C., FORD, T. e LASTI, N. Organochlorine residues in British Otters *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 36, p. 656 – 661, 1986. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.
- MATHIESSEN, Peter. Historical perspective on endocrine disrupter in wildlife. *Pure and Applied Chemistry*, v. 75, p, 2197-2206, 2003.
- MAZUR, W. e ADLERCREUTZ, H., Naturally occurring estrogens in food. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1776, 1998.
- McLACHLAN, J. NEWBOLD, R., BULLOCK, B., Reproductive tract lesion in male nice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science* v. 190, p. 991 – 992, 1975.

- MELO, L. F. C. Desenvolvimento de metodologias e de novos materiais para determinação multirresíduo de pesticidas em uva e tomates por cromatografia líquida de alta eficiência. *Tese de doutorado* Instituto de Química. UNICAMP fevereiro de 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2004). Portaria nº 518 GM de 25/03/2004.
- MYAMOTO, J. e KLEIN, W. Environmental exposure, species differences and risk assessment. *Pure & Applied Chemistry*. V. 70, n.9, p. 1829-1849, 1998.
- MOL, H.G.J., SUMARTO S. e STEIJGER, O. M. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A*, v. 879, p. 97-112, 2000.
- NEWBOLD, R. e MCLACHLAN. Vaginal Adenosis and adenocarcinoma in mice exposed prenatally Neonatally to diethylstilbestrol. *Cancer Research*, v. 42, p. 2003 – 2011, 1982. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997
- NIESSEN, W.M.A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, New York, 2ed Marcel Dekker Inc.1999.
- NGHIEM, L.D., SÄCHER, A.I., ELIMELICH, M. Removal of natural hormones by nanofiltration membranes: measurement, modeling, and mechanisms. *Environmental Science technology*, v. 38, p.1888-1896.
- .
- NORIEGA, N. C., OSTLY, J., LAMBRIGTH, C., WILSON, V. S., JR. GRAY, E. Late gestational the fungicide Prochloraz delays the onset of parturition and causes reproductive malformations in male but not female rat offspring. *Biology of Reproduction*, v.71, p. 1324-1335, (2005)

- OAKES. K. D.; TREMBLAY, L. A.; KRAAK, G.J. Short-term lab exposures of immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to sulfite and kraft pulp-mill effluents on oxidative stress and circulating sex steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.24 ,p.1451-1461, 2005.
- OEHME. M., BERGER U, BROMBACHER S., KUHN F., KÖLLIKER S. Trace analysis by HPLC-. MS: contamination problems and systematic errors *Trends in Analytical Chemistry*, v,21,n.5, p.322-342, 2002.
- OEHTMANN, U.S., ALBANIS T., ALLERA A., BACHMANN J., BERMISSON P., BERESFORDN., CARNEVALI D. C. , CICERI F., DAGNAC T., FALANDYSZ J., GALASSI S.,HALA D., JANER G., JEANNOT R., JOBLING S., KING I., KLINGM6ULLER D., KICAS W., KUSK K., LEVADA R.M, LO SUSAN, LUTZ I., OEHLMAMMJ. OREDSSON S., PORTE C., WEAVER R,M. SAKITAS V., SUGNI M., TYLER C., AERTE R. BAFLEGOY C., WOILRNBERGER L. , Compreendo: Focus abd Approach *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n S-1 2006. <http://www.ehponline.org/embers/2006/8060/8060.html> Retirado em 23/04/2007.
- OLBROOK, R.D., LOVE, N.G. NOVAK,J.T. Sorption of 17 β -estradiol and 17 α ethinylestradiol by colloidal organic carbon derived from biological wastewater treatment systems. *Environmental Science &Technology*, v.38, p.3322 – 3329, 2004.
- OHK, Y., IUCH, K I., TATSUMA, T., NAKASHIMA, T., IGUCHI, T., KUBOTA,Y., FUJIHIMA, A. 17 β Estradiol degradation by TIO₂ photocatalysis as mean of reducing estrogenic activity. *Environmental Science & Technology*, v.36, p.4175 – 4181, 2002.
- OOSTERKAMP, A. J., HOCK, B., SEIFERT, M., IRTH, H. Novel monitoring strategies for xenoestrogens. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 16, n. 10, 1997.
- OSTERHAUS, A. SEAL DEATH. *Nature*, v. 334, p. 301 – 302, 1988.

- PALMLUND, I. APFEL, R., BUITENDIJK, S., CABAV, A e FORSIBERG, J. Effects of dethylestilbestrol (DES) medication during pregnancy: report from a symposium on the 10th. International Congress of ISPOG Journal of Psychosomatic Obstetrical Gynecology, v. 14, p. 71 – 89, 1993. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.
- PATLAK M. A testing deadline for endocrine disruptors. Environmental Science & Technology, v.30, n.12, p. 540- 544, 1996.
- PETERS, L.D.,DOYOTTE,A.,MITCHELMORE, C.L., McEvoy.,LIVINGTONE, D.R. Seasonal variation and estradiol-dependent elevation of Thames estuary el *Anguilla Anguilla* plasma vitellogenim levels and comparisons with other United Kingdom estuaries. *The Science of he Total Environment*, v. 279, p.137-150.,2001
- PEROVIC M., ELJARRAT E., ALDA, M.J.L., BARCELÓ, D. Analysis and environmantal level of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *Trends Analytical Chenistry*, v.20, n. 11 , p. 637-648, 2001
- PEROVIC M., LACORTE, S., VIANA, P., BARCELÓ,D. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *Journal of Chromatography A*.v. 959,p.15-23, 2002.
- PIVA, F. e MARTINI, L. Neurotransmitters and the control of hypophysid gonodal functions possible implications of endocrine disruptors. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1647 – 1656, 1998.
- PREZIOSI, P. Endocrine disrupters are environmental signalters: an introduction. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1617 – 1631, 1998.

- PURDOM, C., HARDIMAN, P., BYE, V., ENO, N., TYLER C. e SUMPTER, J. ROUTLEDGE E. J. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, v. 8, p. 275 – 285, 1994.
- QUEIROZ, S.C.do N. Determinação de multirresíduos de pesticida em água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com ênfase em detecção em Espectrometria de Massa e novos sorventes para extração em fase sólida. Campinas. Instituto de Química, Unicamp. 2001.
- REIJNDERS, P. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature*, v, 324, p. 456 – 457, 1986. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.
- REYERO, N.G., PINA, B., GRINALT, J.O., FERNÁNDEZ, P., FONTS R, R., POLVILLO, O., MARTRAT,B. Estrogenic activity in sediments from European Mountain Lakes. *Environmental Science &Technology*, v.39, p.1427 – 1435, 2005.
- RIBANI, M.,BERTTOLI, C.B.G.,COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5,p.771-7780, 2004.
- RIBEIRO,A A.L.F.A., FERREIRA, A.P., CUBHA, C. L. N.da , KLING, A.S.M. Disruptores endócrino: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. *Rev. Biomed*, v.17,p.146-150, 2006.
- ROSENFELDT, E.J., LINDEN, K.G. Degradation of endocrine disrupting chemical bisphenol A, ethinyl estradiol and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environmental Science & technology*, v.38 p.5476 – 5483, 2004
- ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAN, DESBROW, C., BRIGHTY, C. G, WALDOCK, M. e SUMPTER, J. P. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Z. In vivo responses in trout and ruack. *Environmental Science & Technology*, v. 32, n.11, p. 1559 – 1565, 1998.

- ROUTLEDGE, E. J. e SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241 – 248, 1996.
- SADIK. O. A. e WITT. D. M. Monitoring endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Science & Technology*, p. 368-374, 1999.
- SAITO, S., HATTORI, K., YAMAZAKI, Y. Removal characteristics of emerging water contamination chemicals by advanced water treatment processes.(2003) SciFinder Scholar-27/09/07.
- SAITO, MITSUI T., MIZUMOT. Gennistein represses the induction of prostatic buds by testosterone. *J.Soc. Biol.v.194 ,p.9597 2000*. www.bireme.br – medline. Retirado em 25/06/2002
- SANASA. *Estações de tratamento*. www.sanasa.com.br retirado em 22/09/2007
- SANTAMARTA, JOSÉ. Ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*. Porto Alegre,v.2,n.3.julho/agosto 2001.
- SANASA-2007 Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S.A. Acessado em 23/12/07 http://www.agua.org.br/Html/saneamento/Diagnostico%20dos%20municipios_agua.pdfvv.
- SCHÄFER, A. I. and WAITE, T. D. Removal of endocrine disrupters in advanced treatment: the Australian approach .Apud *International Water Association Home page*: workshop on endocrine disruptors, 7–12 april 2002
- SCHÄFER, A.I., NGHIEM, L.D., WAITE, T.D. Removal of the natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. *Environmental Science & technology*, v.3 , 182- 188, 2003.

- SEKI, Masanori; YOKOTA, Hirofumi; MAEDA, Masanubu; KOBAYASH, Kunio. Fish full life-cycle testing for 17 β -estradiol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. V.24 n.5, p.1259-1266, 2005.
- SKAKKEBAEK, N.E., LEFFERS H., RAJPERT-DE MEYTS E. R., CARLSEN E., GRIGOR K. M., Should we watch what we eat and drink? Report on the international workshop on hormones and endocrine disrupters in food and water; possible impact on human health, Copenhagen, Denmark, 27-30, may 2000. *Trends Endocrinol Metab*. Vol. 11, n.7, p.291-293, 2000. www.bireme.br – medline.
- STACKELBERG, P.E., DURLONG. E. T., MEYER, M. T., ZAUGG, A. K., REISSMAN. D. B., Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment. *Science of Total Environment*, v.329, p 99- 113, 2004
- SLUCZEWSKI, A. ROTH, P. Gynecology and Obstetrics 47, 164 – 176 (1948). Apud *International Water Association Home page: workshop on endocrine disruptors*, 7 – 12 april 2002. www.iwahq.org.uk/template.cfm?name=edworkshop.
- SNYDER, S A. Endocrine disruptors and pharmaceutically active compounds: U.S. regulations and research. *International Water Association Home page: workshop on endocrine disruptors*, 7 – 12 abril 2002. www.iwahq.org.uk/template.cfm?name=edworkshop.
- SNYDER, S.A. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental Science & Technology*, v.33, p.2814-2820, 1999.
- SHARPE, R. M. Environmental estrogens and male infertility. *Pure & Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1685 – 1701, 1998.

- SHORE S..LAURENCE e SHENESH MORDECHAI. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure Applied Chemistry*, v.75.p1859-1871, 2003
- SHORE, S. L., GUREVITZ, M. e SHEMESH: Estrogens as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, v. 51, p. 361 – 366, 1993.
- SOUZA ,M. F., SOARES, R. de M. Ultrafiltro de alumina (Alumina ultrafilter). *Cerâmica* v.45 , p.292-293 São Paulo Mar./Jun. 1999.
- SOLÉ M., ALDA, M. J. L. de, CASTILLO, M., PORTE, C., PEDERSEN, K. L. e BARCELÓ, D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters form the Catalonian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology*, v. 34, n. 24, p. 5076 – 5083, 2000.
- SOTO, A. e SONNENSCHNEIN, C. Cell proliferation of estrogen sensitive cells: the case for negative control. *Endocrine Reviews*, n. 8, p. 44 – 52, 1987. Apud COLBORN *et al.* O futuro roubado, 1997.
- SOTO, A., JUSTICIA H., WRAY e SONNENSCHNEIN, C. p – Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, v. 92, p. 167 – 173, 1991. Apud COLBORN *et al.* O futuro roubado, 1997.
- SOUSA, M. F. e SOARES, R de M. Ultrafiltro de alumina.*Cerâmica*,v.45, n.292-293, 1999.www.scielo.br/scielo.php?pid=S036669131999000200004&script=sci_arttext - 36k – retirado em 30/04/08
- STACKELBERG, P.E., DURLONG. E. T., MEYER, M. T., ZAUGG, A. K., REISSMAN. D. B., Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment. *Science of Total Environment*, v.329, p 99- 113, 2004.

- STUMM-Zollinger e FAIR, G.M. Biodegradation of steroid hormones . *J. Water Pollt. Comt. Fed.* , v.37, p.1506-1510,1965. apud KIM et al 2006,
- SULTANA, R., SODA, K, YASUDA, K., TAMOTSU, S., TADASHI, O. Effects of estrogens (17 β -estradiol) and p-nonylphenol on the development of immune organs in male Japanese quail. *Environmental Science*, v.12, p. 99-110, 2005.
- SUMPTER J.P., JOHNSOM , A.C. Lessons from endocrine disrupter and their application to other issue concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 12, p. 4321 – 4332, 2005.
- TABAK, R.N. e BUNCH, R.L. Steroid hormones as water pollutants I. Metabolism of the natural and synthetic ovulation-inibing hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage. *Dev. Ind. Microbiol.*, v. 11, p367- 376 1970. Apud KIM et al 2006.
- TABAK, R.N. e BUNCH, R.L. Steroid hormones as water pollutants II. Studies on the persistence and stability of nural urinary and synthetic ovulation-inhibiting hormones in untreated and treated wastewater. *Ind. Microbiol.*, v.22, p.497-519, 1981 Apud KIM et al 2006.
- TAKAI, Y., TSUTSUMI, O., Synthetic estrogen as an endocrine disruptor-diethystillbestrol and oral contraceptives. *Nipon Rinsho*, v. 58, n.12, p. 2404 – 2416, 2000. www.bireme.br – Medline 2000.
- TERMES, T.A., SUMPF, M., HABERER, K., WILKEN, R.D, SERVOS,M.. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*, v. 225, p. 81-90, 1999.

- TERMES,T.A., KRECKEL,P.,MULLER,J. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science of the Total Environment*, v. 225, p. 91-99, 1999.
- TERMES, T.A., Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. V.32, p.3245-3260, 1998.
- TERMES,T.A., MEISENHEIMER,M.,McDOWELL D., SACHER, F., BRAUCH, H.J., HAISTE-GULDE, B., PREUSS, G., WILME U., ZULEI-SEIBERT,N. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environment Science Technology*, v.36, p3855-3863, 2002.
- THORPE, K. L., CUMMINGS, R. I., HUTCHINSON, M. S., SCHOLZE, M., BRIGHTY,G., SUMPTER, J. P., TYLER ,C.R. Relative potencies and combination effects of estrogens in fish. *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 2, p.1142– 1149, 2003.
- TOPPARI, J. LAREN, J. C. CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A. GRANDJEAN P. GUILLETTE L. J. JEGOU B., JÉNSEN T. K., JOUANNET P., KEIDING N., LEFFERS H., MCLACHLAN J. N., MEYER O., MULLER J., MEYTS E. R., SCHEIKE T., SHARPE R., JOHN S., SKAKKEBAEK N. E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, v. 104, n. 6, p. 741 – 769, 1996.
- TORRES, J.P., MALM,O., VIEIRA.E.D.R., JAPENGA, J., KOOPMANS , G.F. Organic micro pollutants on river sediments from Rio de Janeiro State, Southeast Brazil *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro* v.18 .p.477-488. 2002
- TREVOR , P.,GRAY, R., JOUBLING, S, NORRESS., KELLY,C., KIRBY,S, TYLER, R.C. JANBAKSH,A.M,HRRIS, J.E., WALDOCK, M.J.,SUMPTER, J.P. and TYLER, R. C. Long-tern temporal changes in estrogenic composition of treated sewage effluent and

its biological effects on fish. *Environmental Science & Technology*, v. 34,p. 1521-1528, 2000.

TYLER, C. R. E ROUTLEDGE, E. J. O Estrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1795 – 1804, 1998.

TYLER, C. R., AERLE, R. van, HUTCHINSON, T.H., MADDIX, S., TRIP, H. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using infusion of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vo.18, n.2, p337-347,1999.

US.EPA; *Removal of endocrine disruptor chemicals using drinking water treatment processes*, EPA/625/R-00/012, Washington D.C.2001

UNITED STATES Pharmacopeia Convention; US Pharmacopeia 24, Validation Methods 1225, Rockville, 1999.

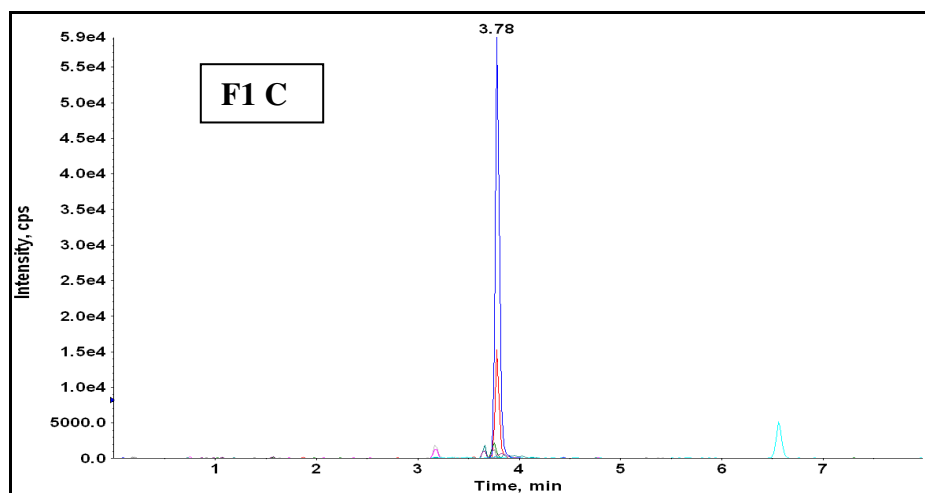
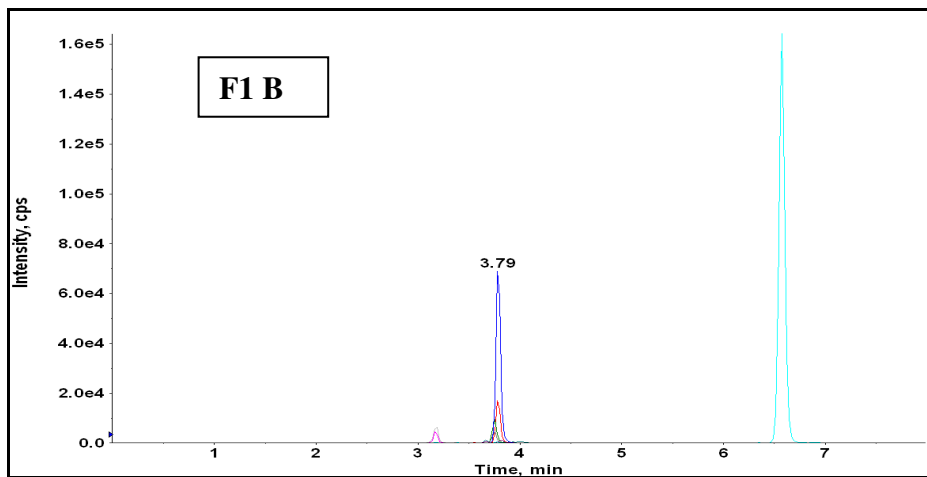
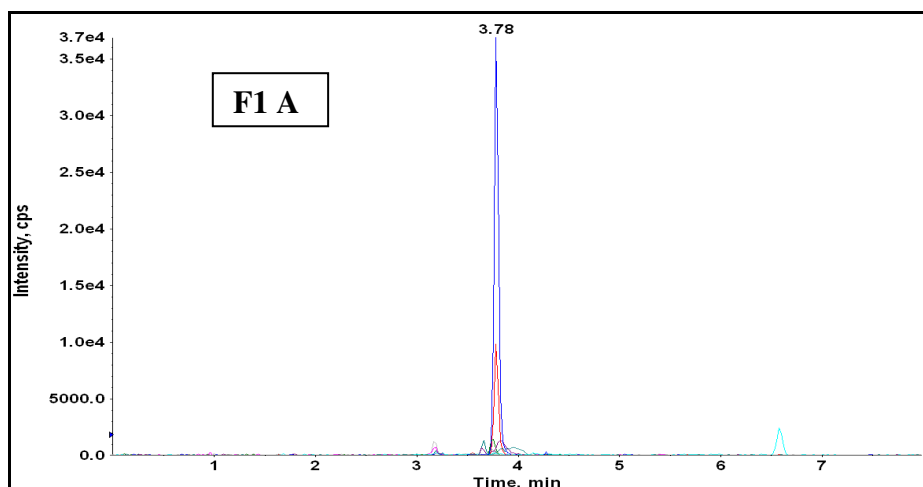
VANDELAC, L. Endocrine disruptors agents: environment, health, public policies and precautionary principle. *Bull. Acad. Med*, v. 184, n.7, p. 1477 – 1486, discussion 1487 – 1490, 2000. Apud www.bireme.br – medline.

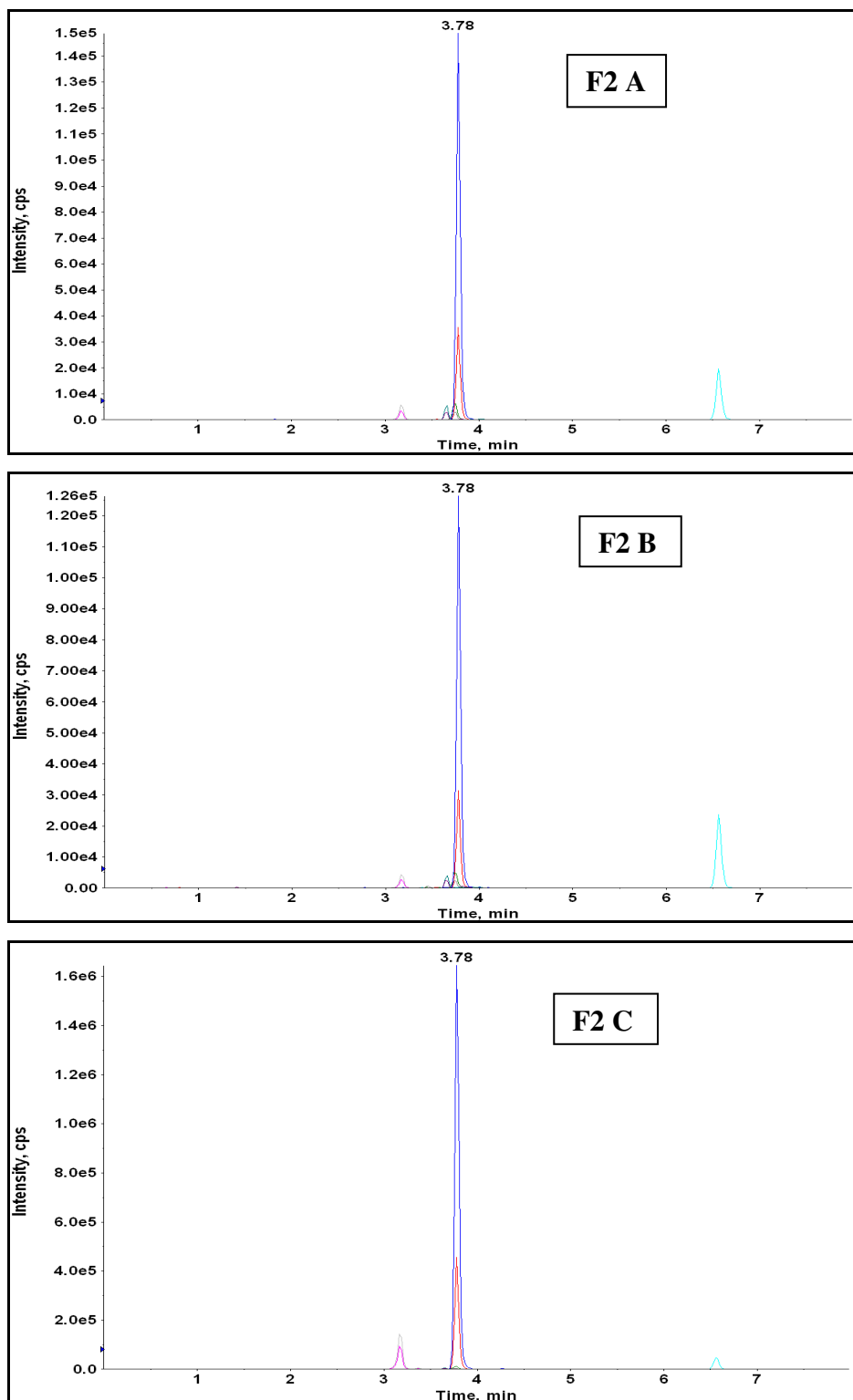
VAN WYK, J. H. Endocrine disruptors in the aquatic environment: The South African research program. Apud *International Water Association. Home page* workshop on endocrine disrupter 7-12 de april 2002. Retirado em 25/06/07. www.iwahq.org.uk//template.cfm?name=edworkshop.

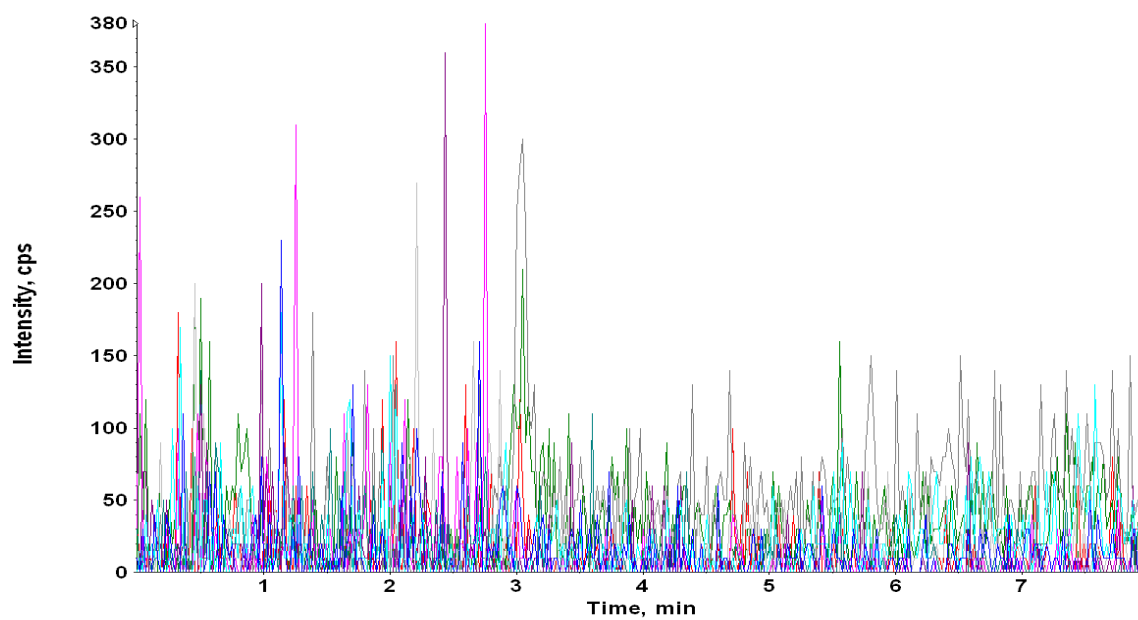
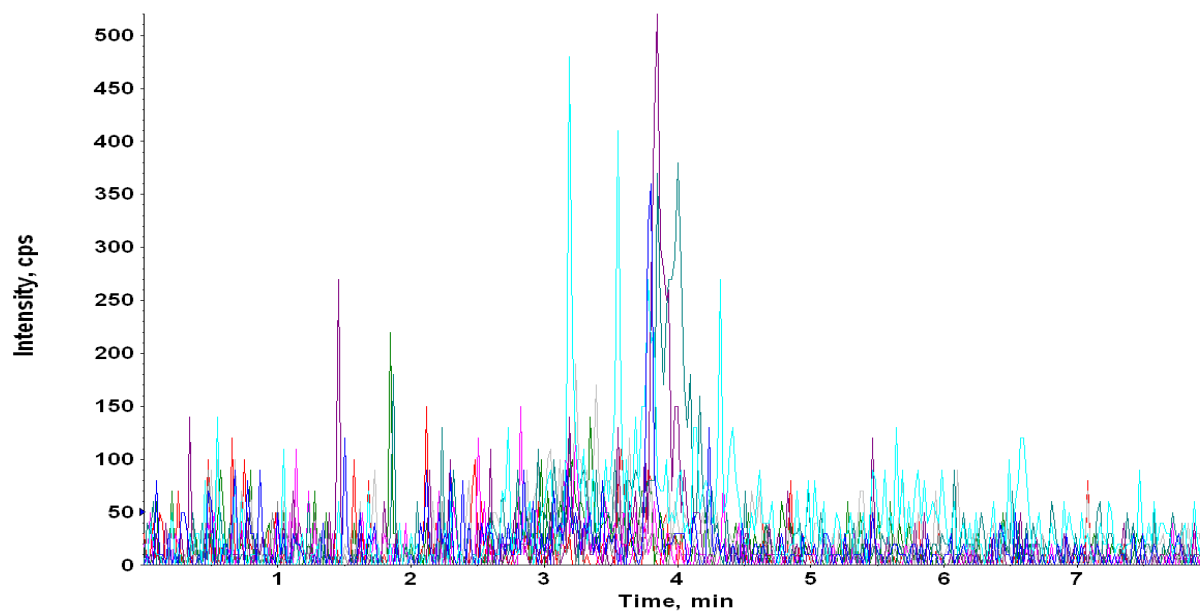
VIRGANÓ, L; ARILLO, A., BOTTERO, S., MASSARI, A., MANDICH A. First observation of intersex cyprinids in the Po River. *The Science of the Total Environment*, v.269, p.189-194, 2001.

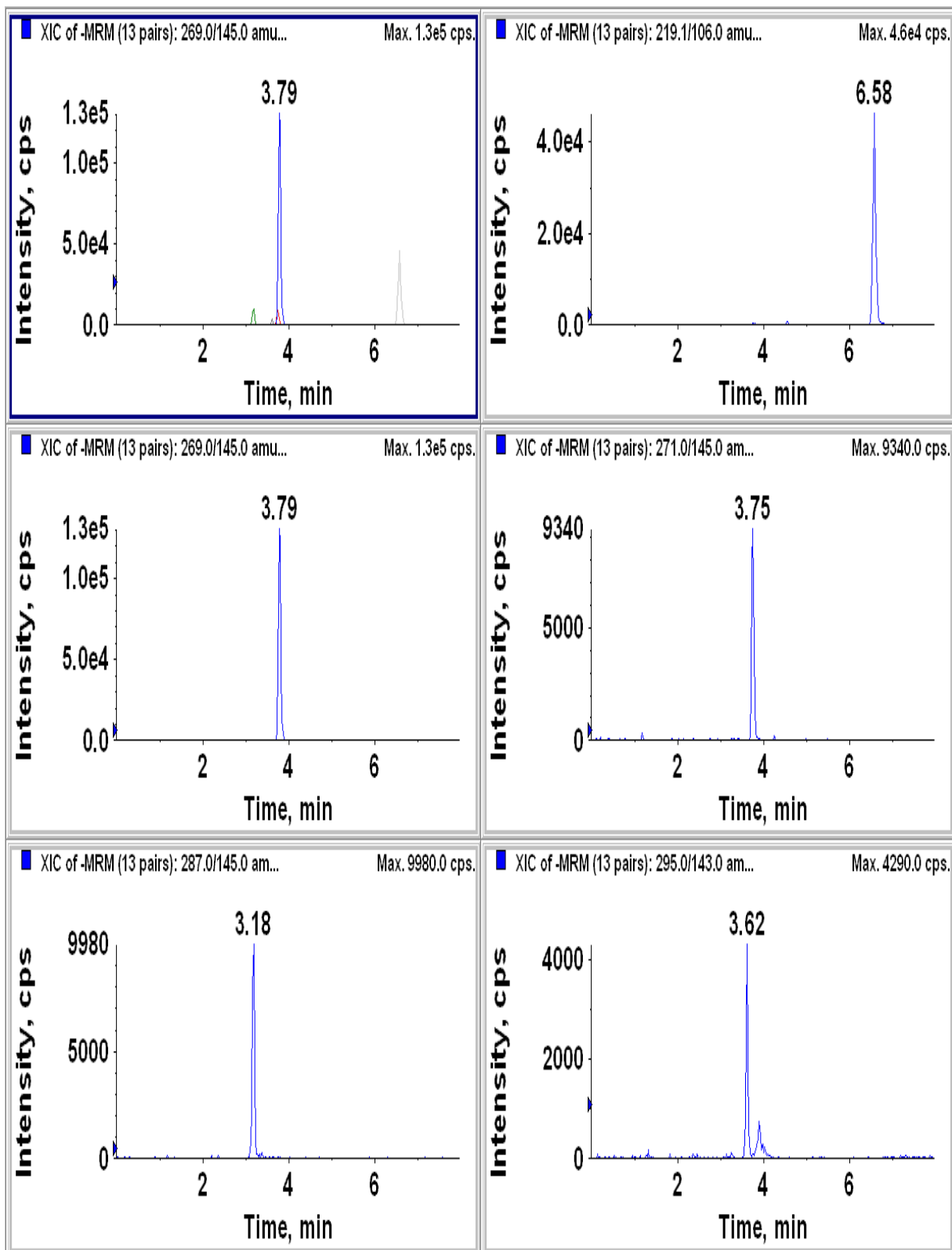
- WALKER, B. S., JANNEY, J. C., Endocrinology 14, 389 – 392 (1930) apud *International Water Association Home page: workshop on endocrine disruptors*, 7 – 12 april 2002. www.iwahq.org.uk//template.cfm?name=edworkshop.
- WANIBUCHI, H., KANG, J.S., SALIM, E.I., MORIMURA, K., FUKUSHIMA, S. Toxicity vs, beneficial effects of phytoestrogens. *Pure Applied Chemistry*, v.75, p.2047-2053, 2003.
- WESTERHOFF Paul. Removal of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products during water treatment. *Southwest Hydrology*. November/December, p 18-19, 2003. www.Swhydro.arizona.edu/archive. retirado 24/09 de 2007.
- WESTERHOFF, P., Yoon, Y., SNYDER, S., SERT, E. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental Science & Technology*, v. 39, p.6649– 6663, 2005.
- WILGARD, D. e TURIEL J. Long-term effects of exposure to diethylstilbestrol. *Journal of western medicine*, v. 149, p. 551 – 554, 1998. Apud COLBORN et al. O futuro roubado, 1997.
- XIAO, X. Y., McCALLEG, D. V., Mc EVOY, J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography – negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, v. 923, p. 195-204, 2001.
- YAMAMOTO, H., LILJESTRAND, H.M., SHIMIZU, Y., MORITA, M. Effects of physical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates. *Environmental Science & Technology*, v. 37, p. 2646– 2657, 2003.

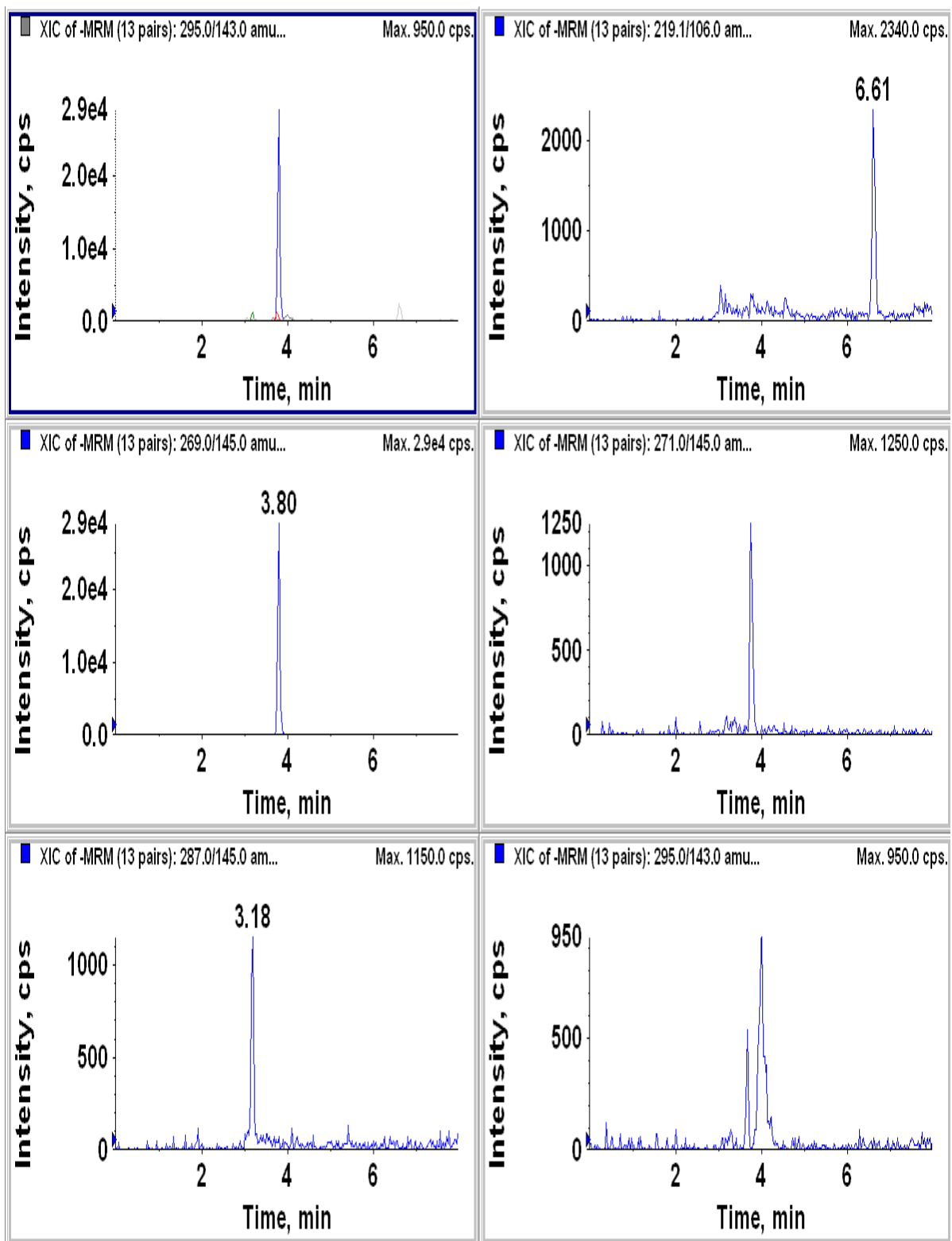
**“ E Deus limpará de seus olhos toda
lágrima; não haverá mais morte , nem pranto,
nem clamor,nem dor; porque as primeiras
coisas são passadas”
Apocalipse 21:4**

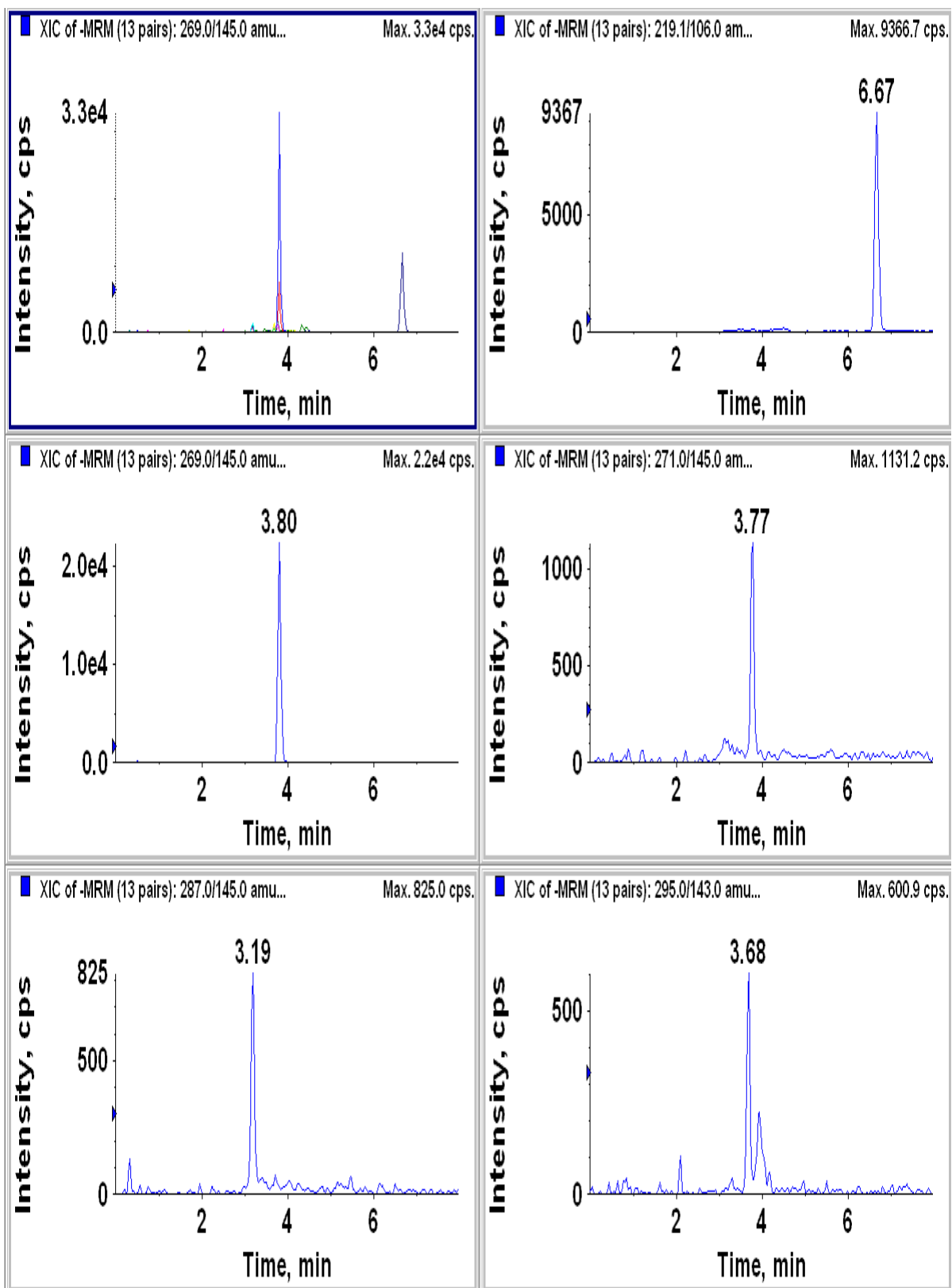
ANEXO 1-Cromatogramas das fortificações (triplicata) na concentração 10ng/L

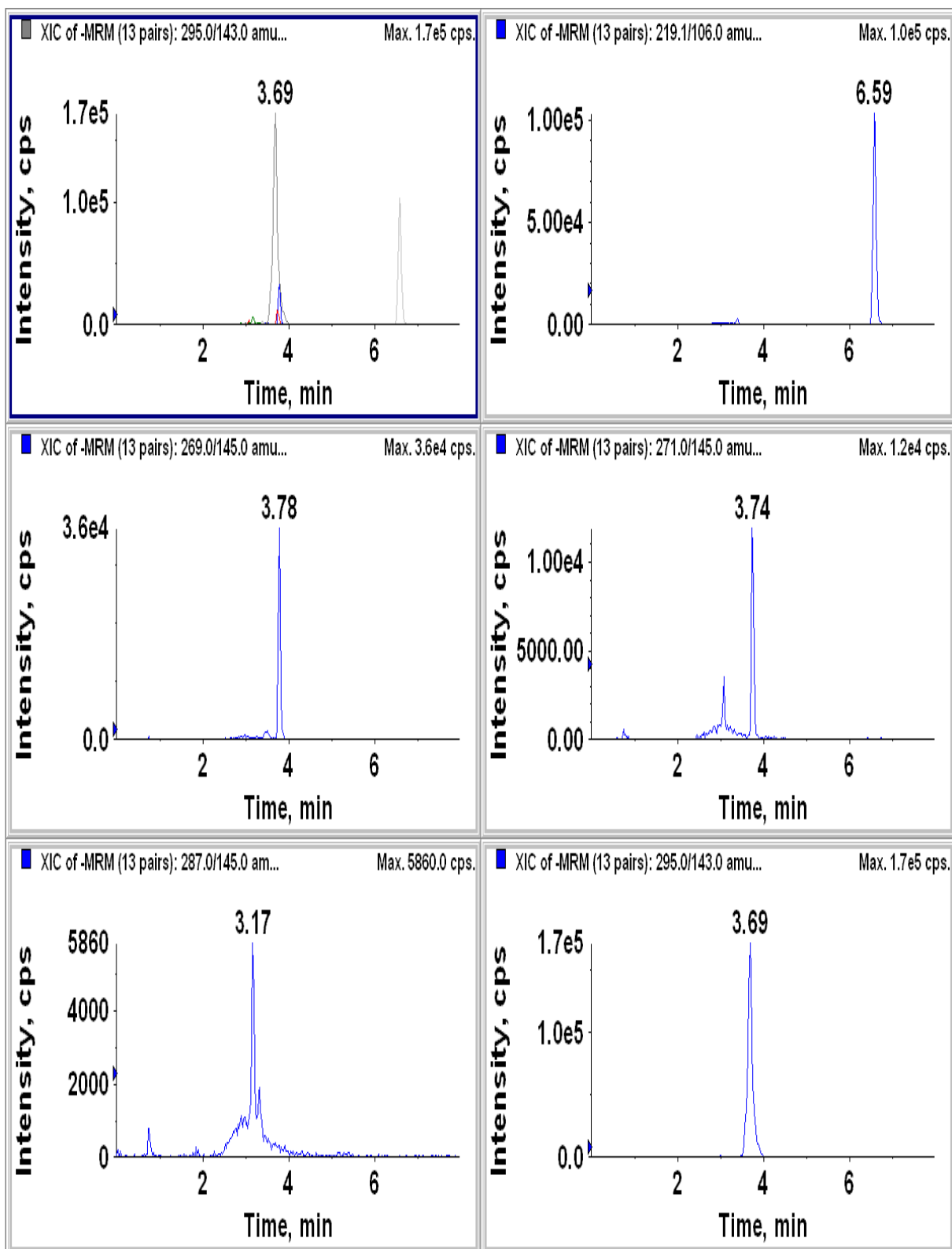
ANEXO 2-Cromatogramas da fortificações (triplicata) na concentração 50 ng/L.

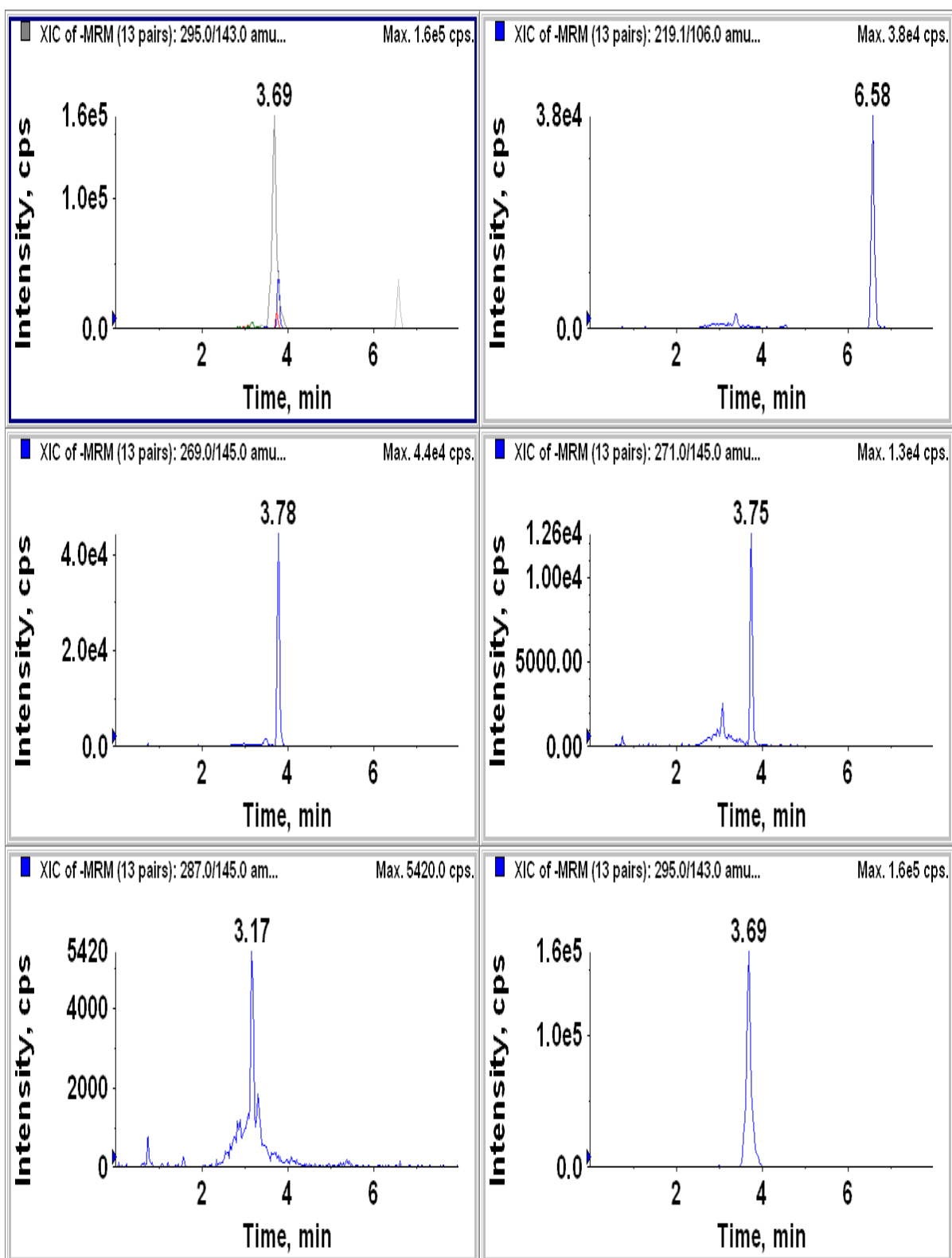
ANEXO 3-Cromatogramas do branco.

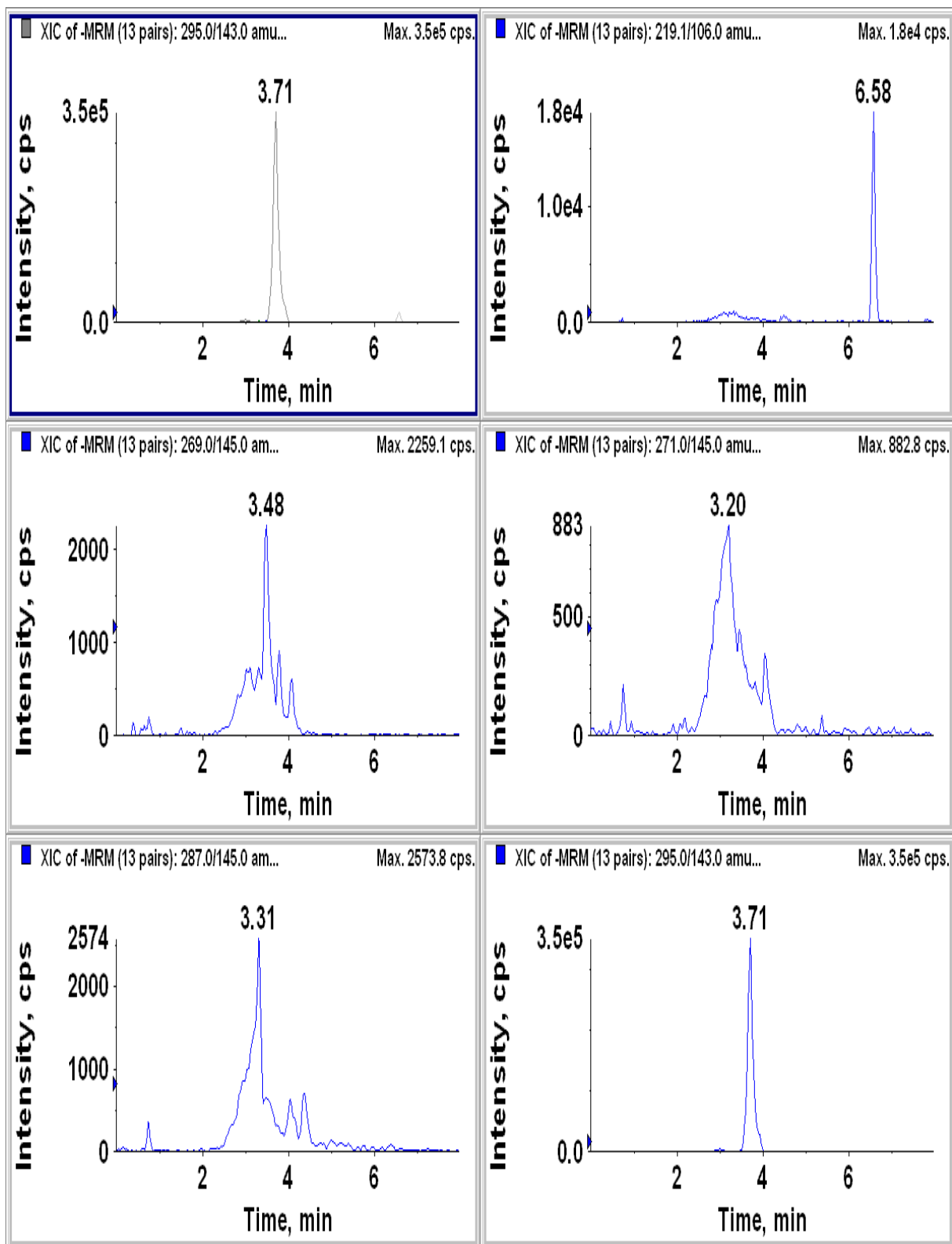
ANEXO 4-Cromatogramas da fortificação na com concentração 10mL/L (F1).

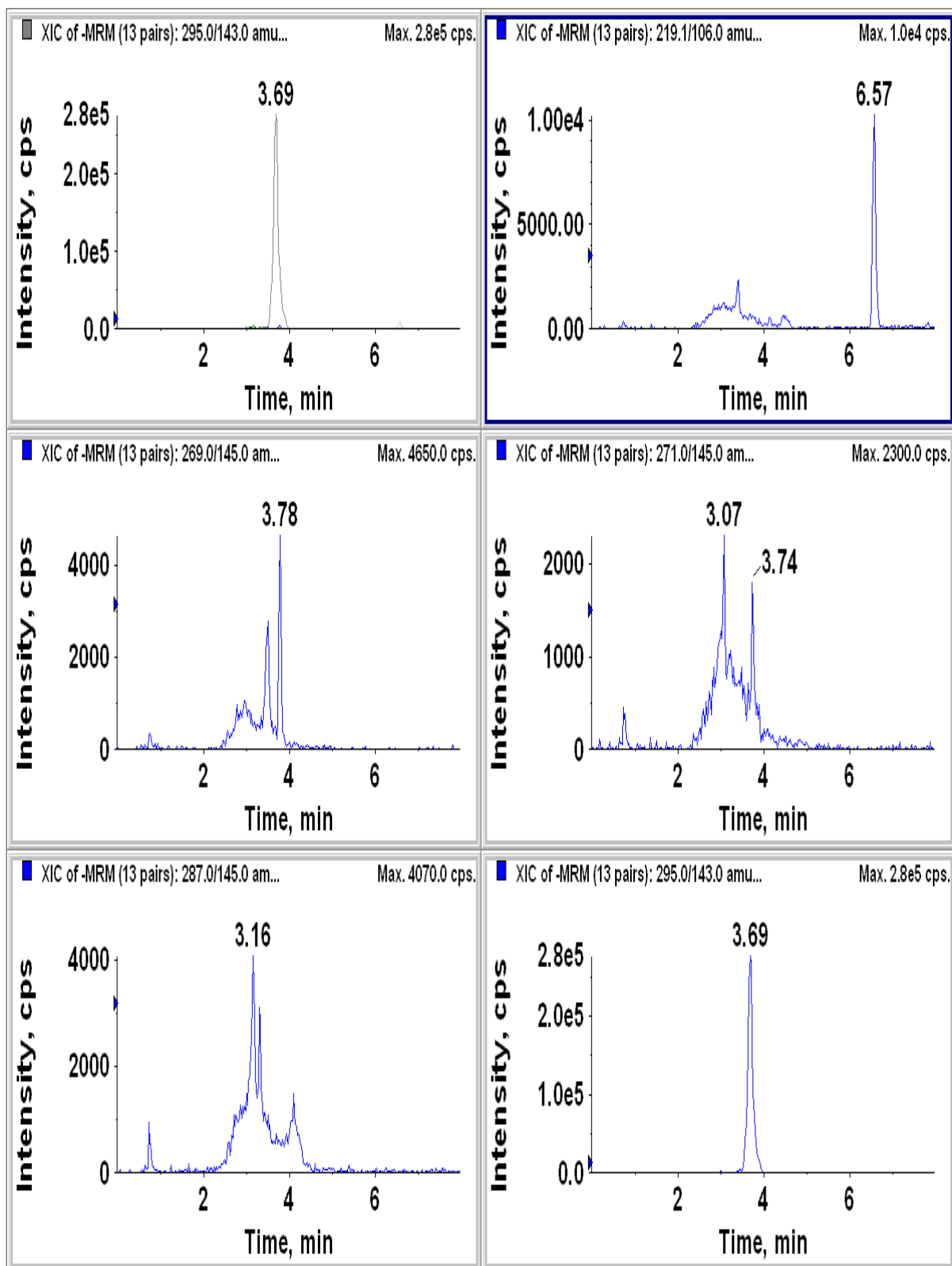
ANEXO 5-Cromatogramas da fortificação na com concentração 10mL/L (F2).

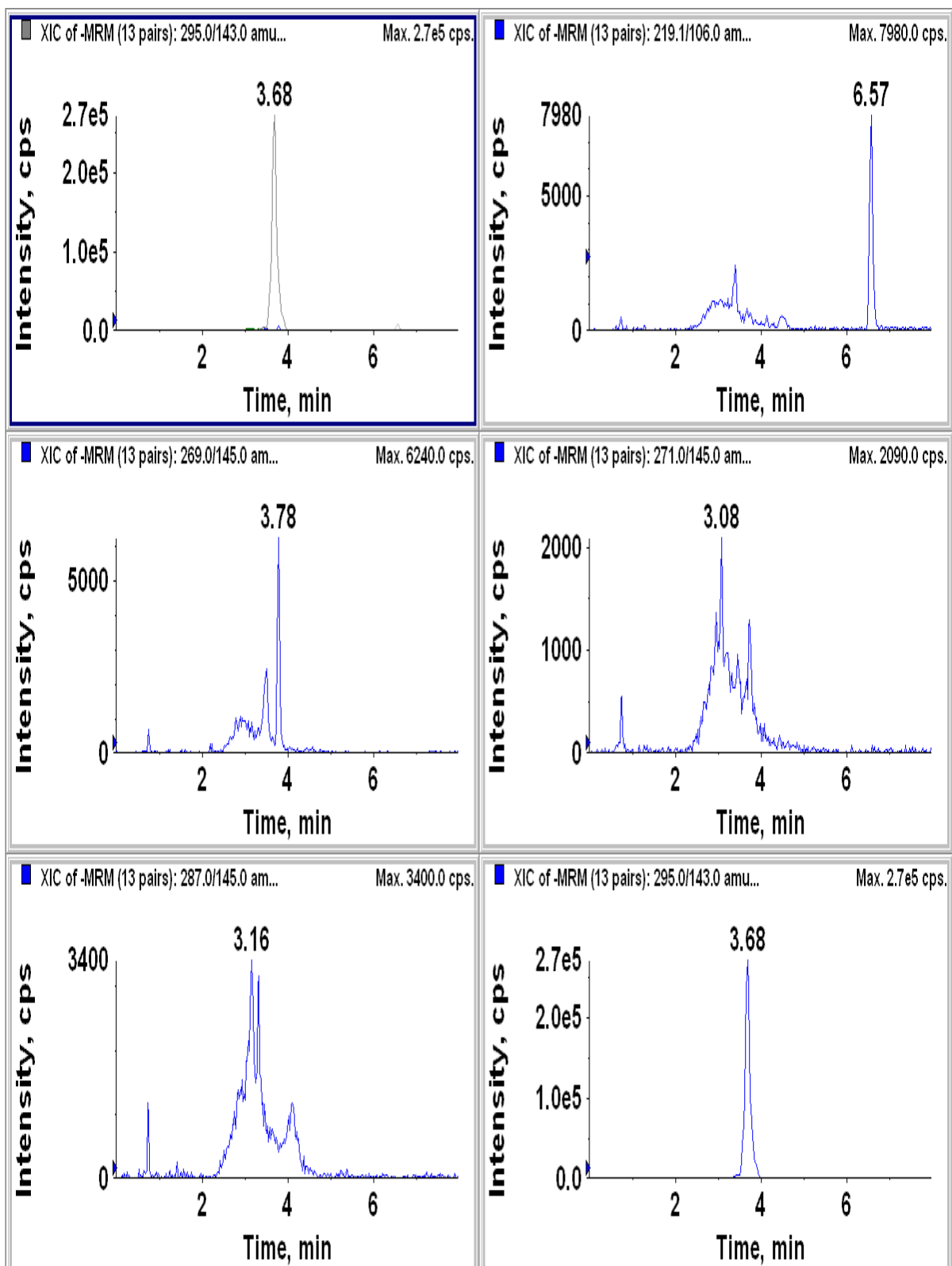
ANEXO 6-Cromatogramas da fortificação na concentração 10mL/L (F3).

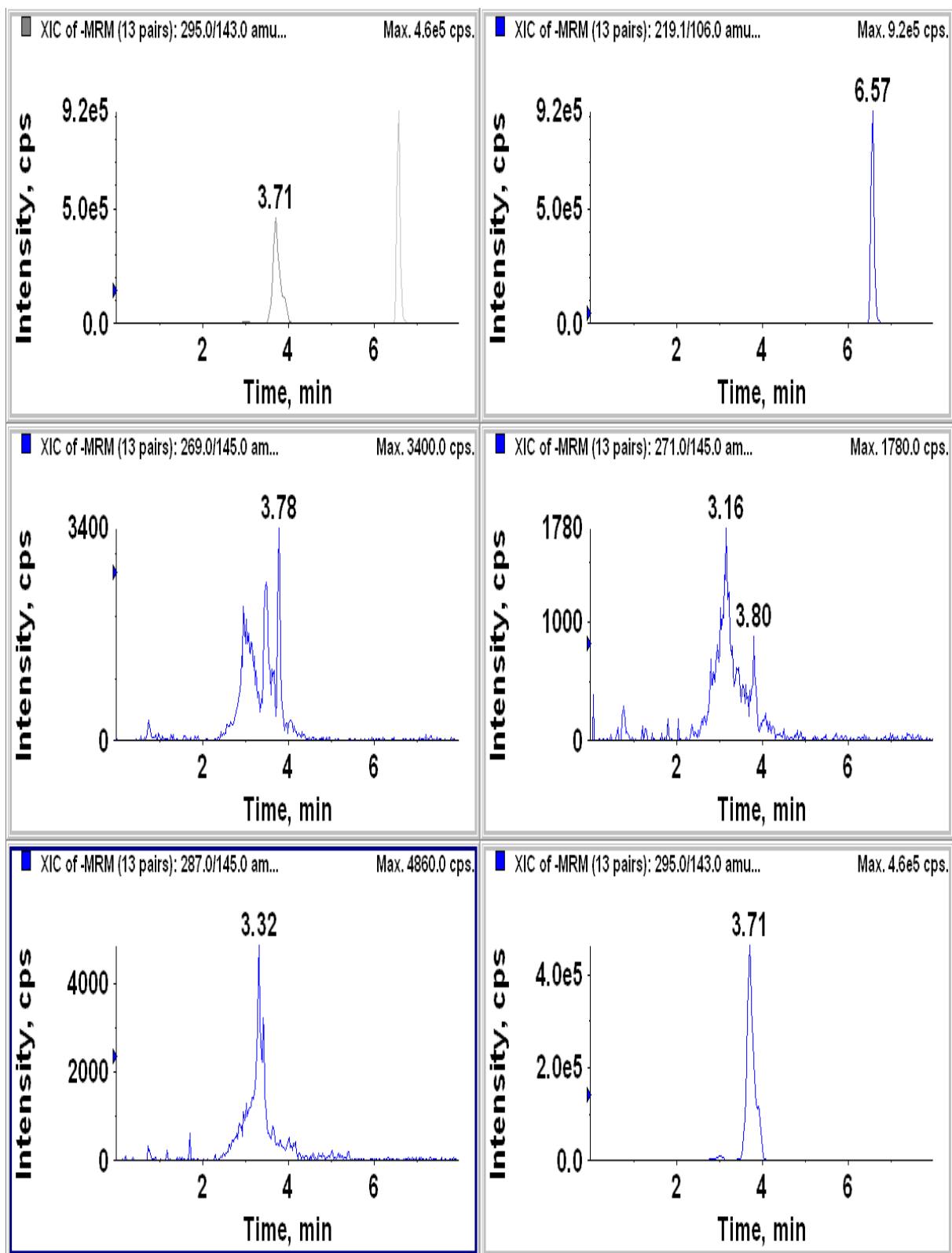
ANEXO 7-Cromatogramas da amostra de Campinas bruta 14/08/07 (CB1).

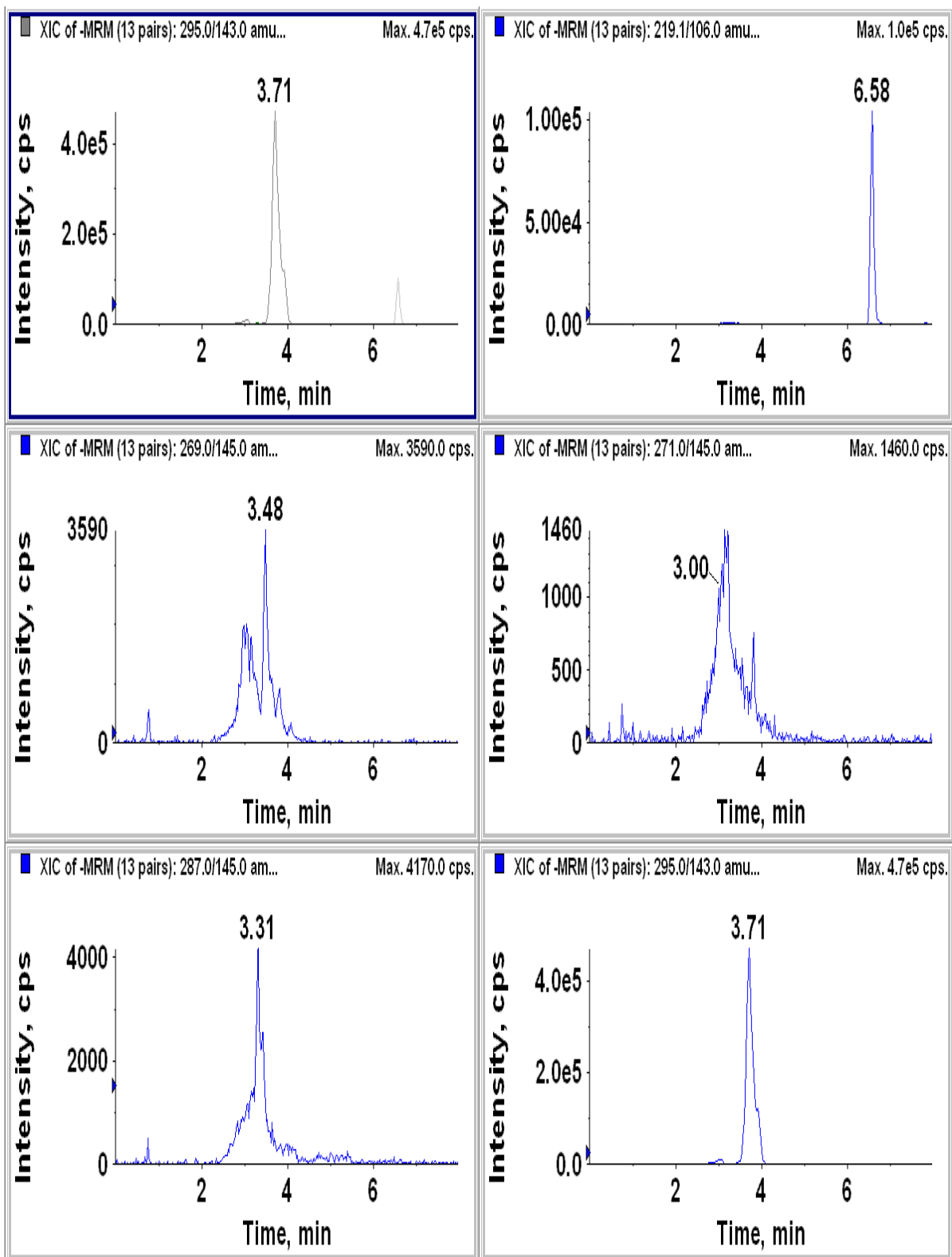
ANEXO 8-Cromatogramas da amostra de Campinas bruta 14/08/07 (CB2).

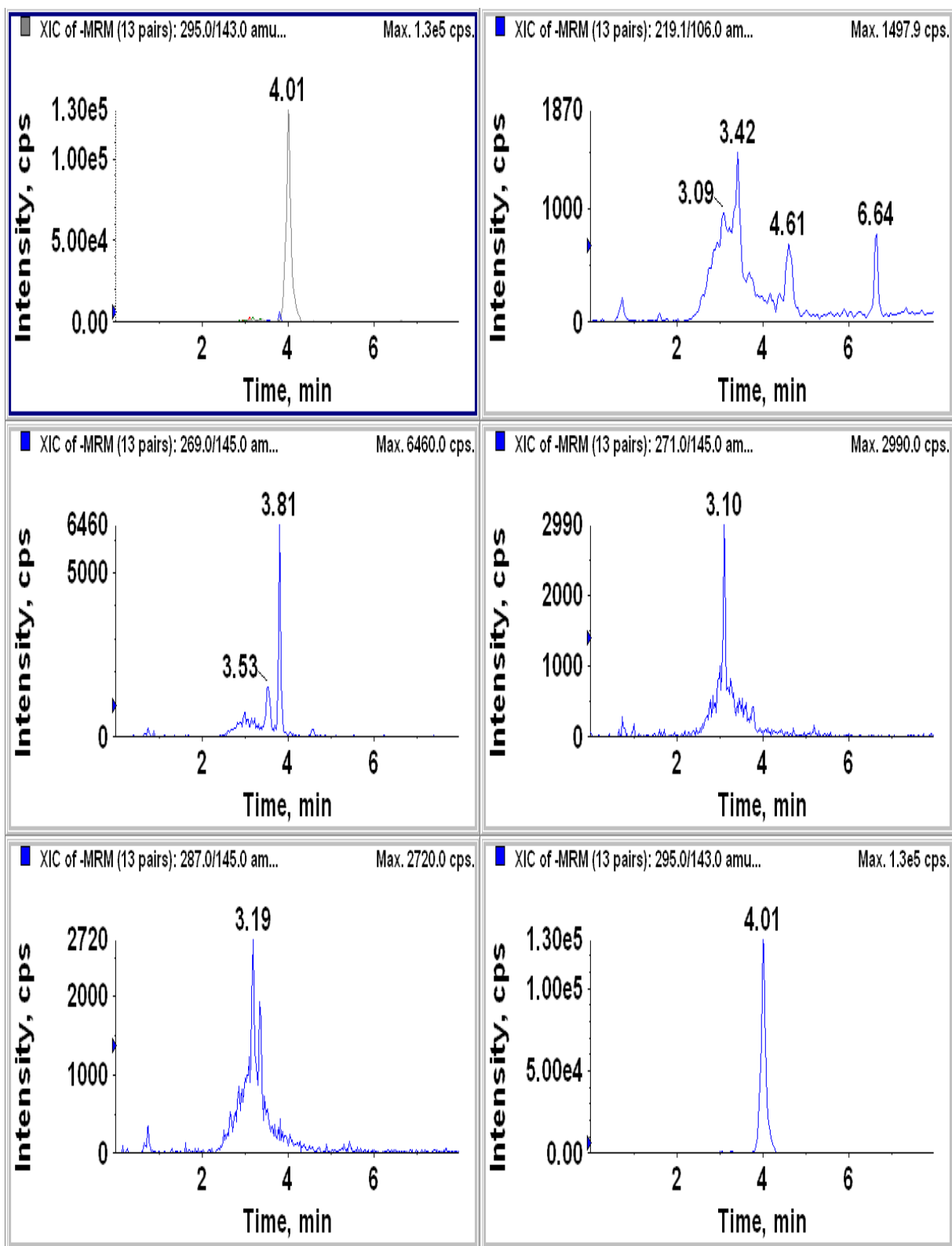
ANEXO 9-Cromatogramas da amostra de Campinas tratada-14/08/07 (CT1).

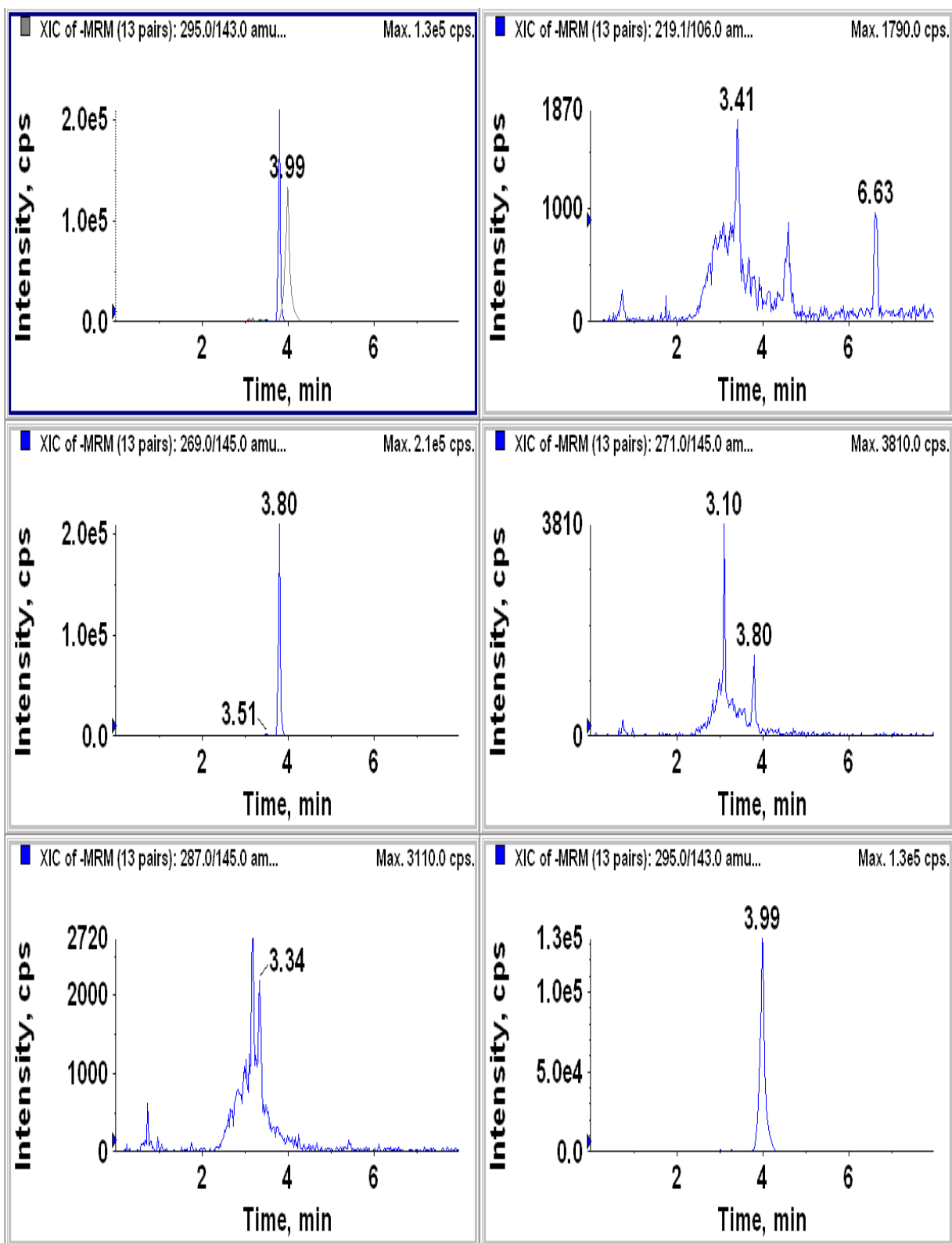
ANEXOS 10-Cromatogramas da amostra de Sumaré bruta-14/08/07 (SB1).

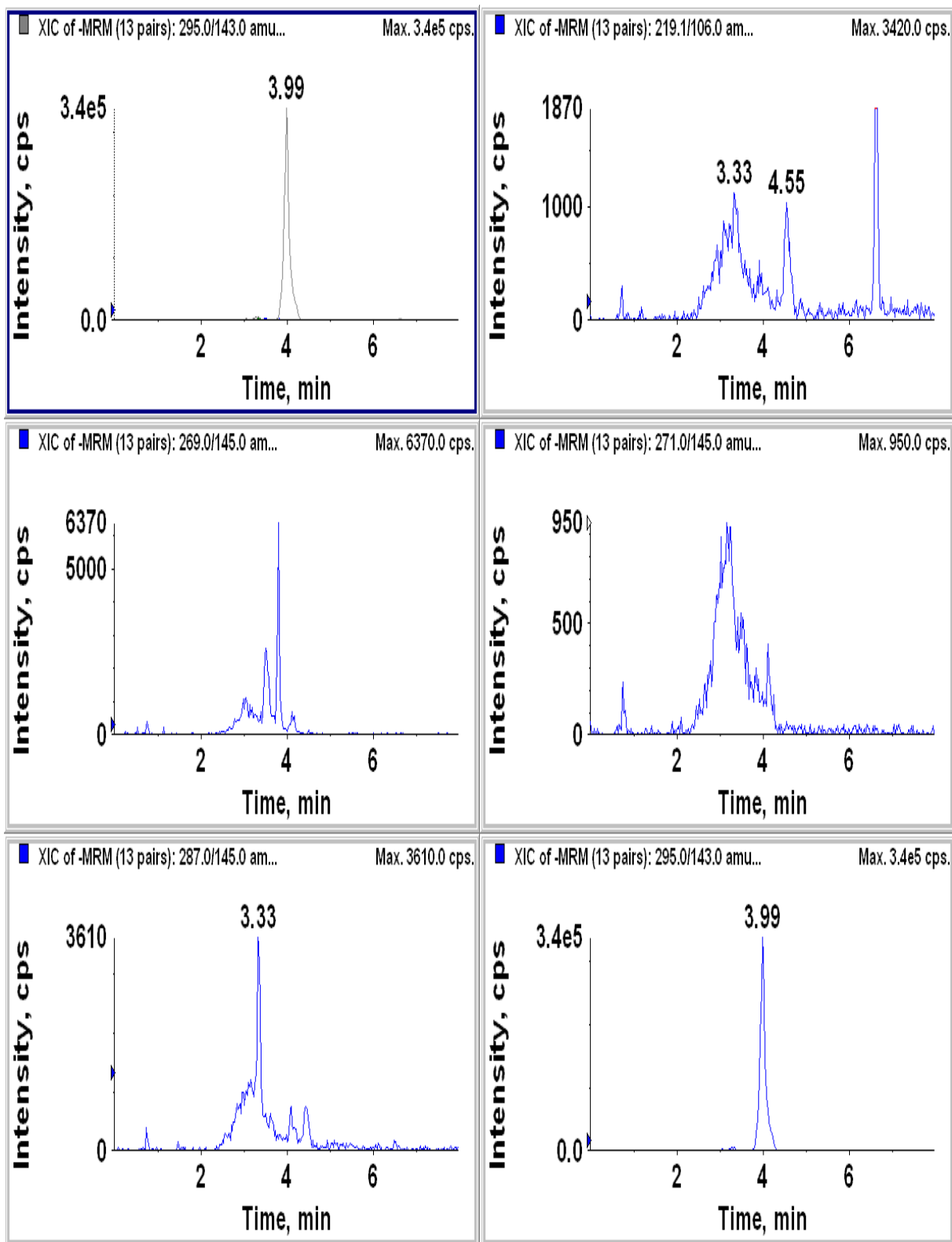
ANEXOS 11-Cromatogramas da amostra de Sumaré bruta-14/08/07 (SB2).

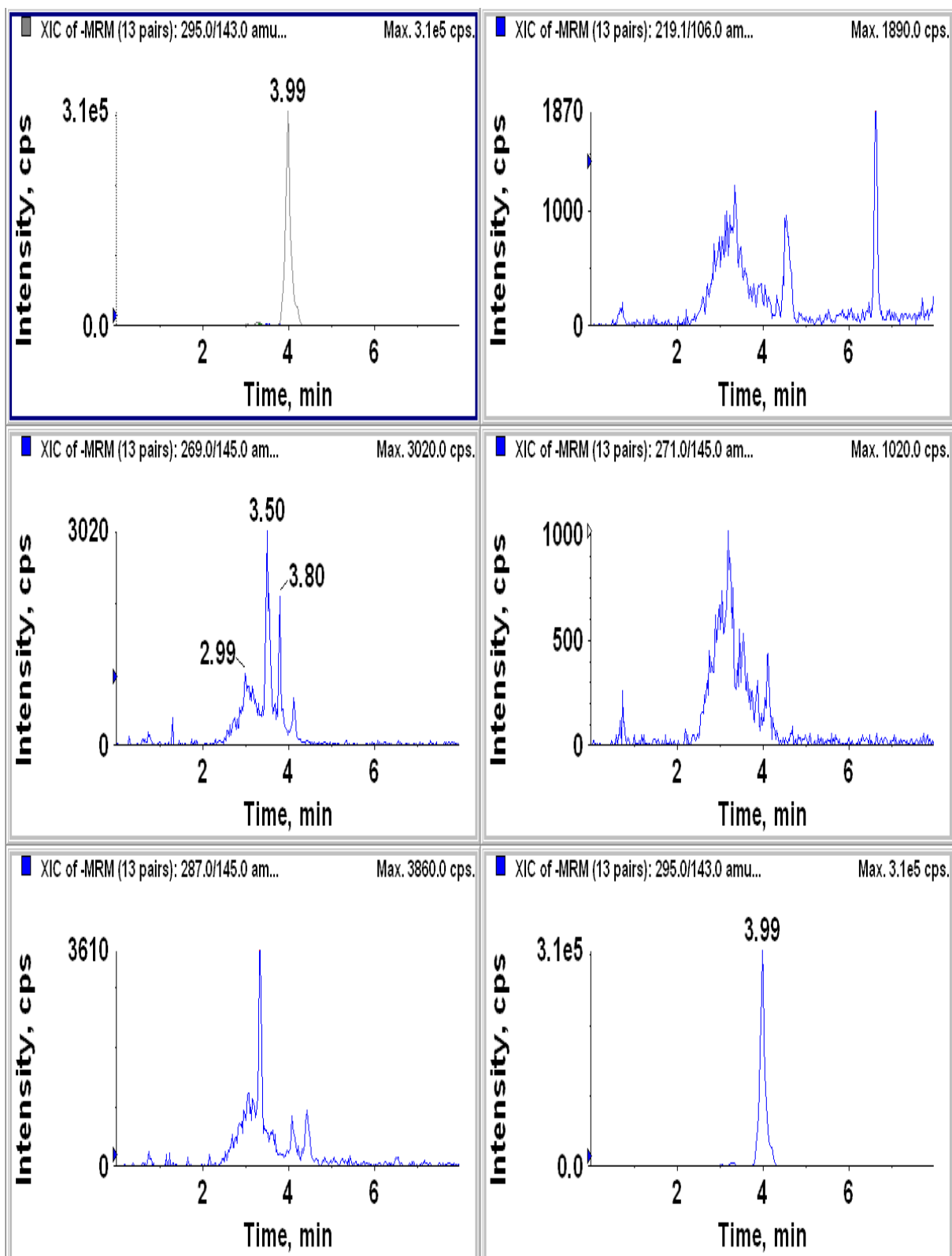
ANEXO 12-Cromatogramas da amostra de Sumaré tratada-14/08/07 (ST1).

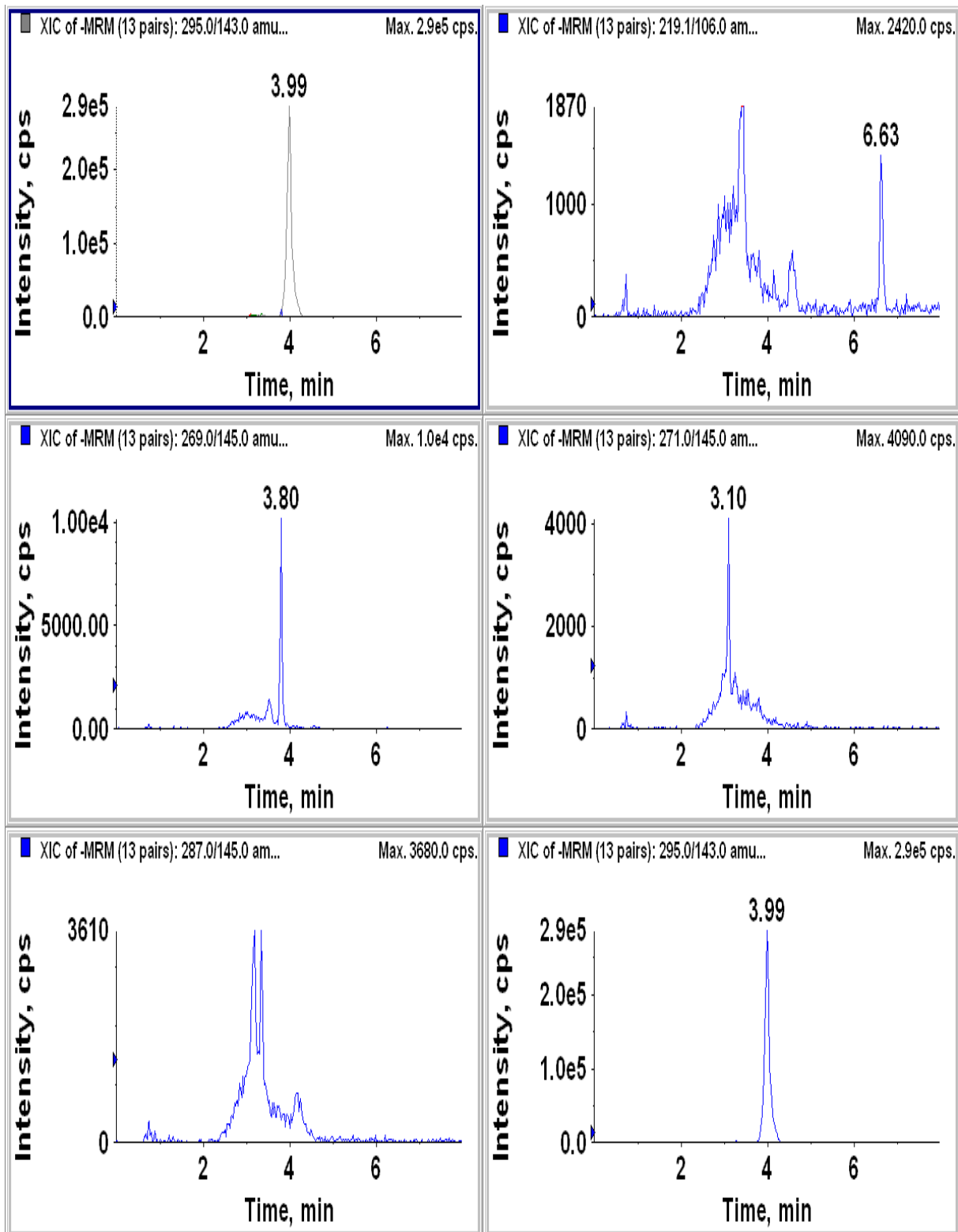
ANEXOS 13-Cromatogramas da amostra de Sumaré tratada-14/08/07 (ST2).

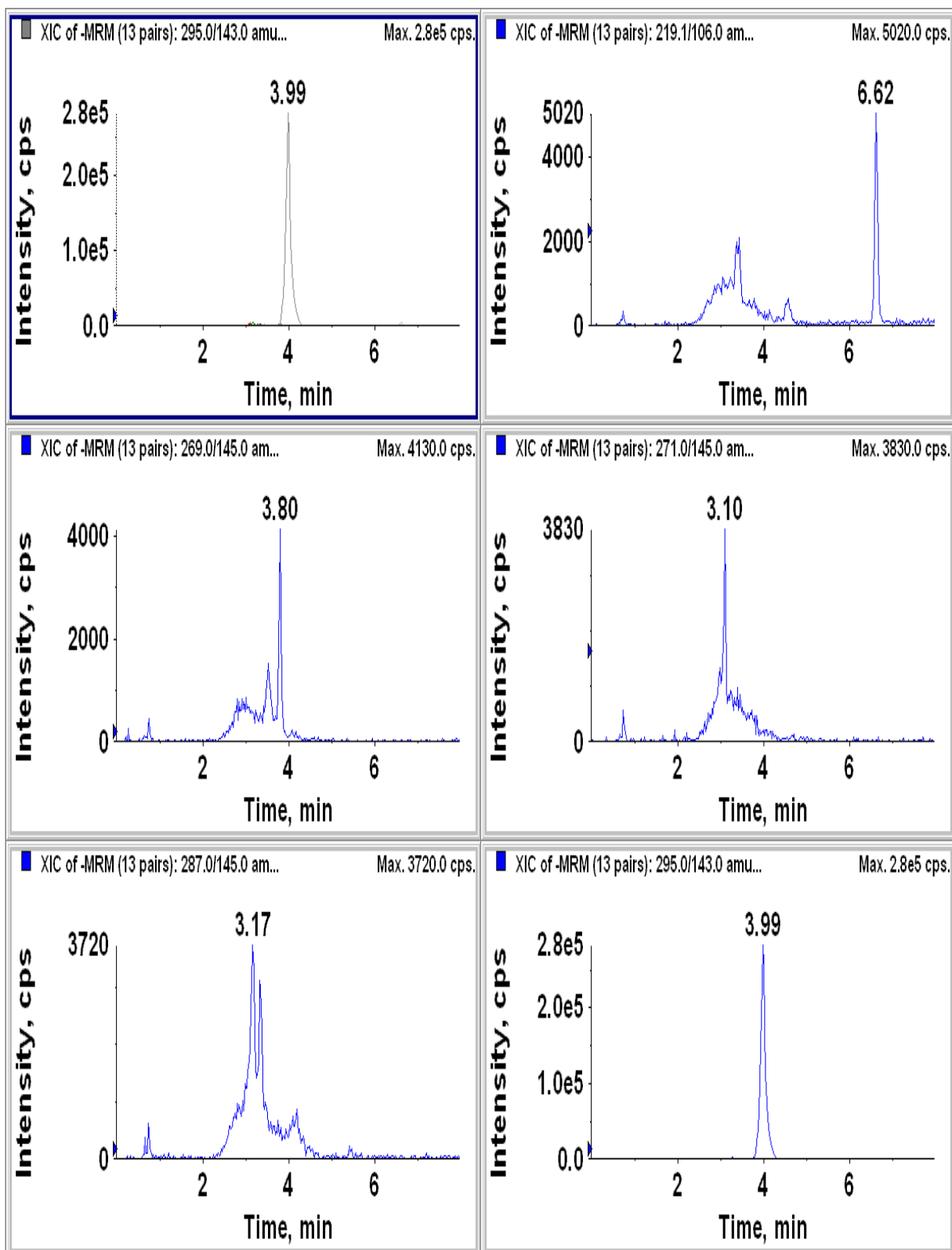
ANEXOS 14-Cromatogramas da amostra de Campinas bruta-27/08/07 (CB1).

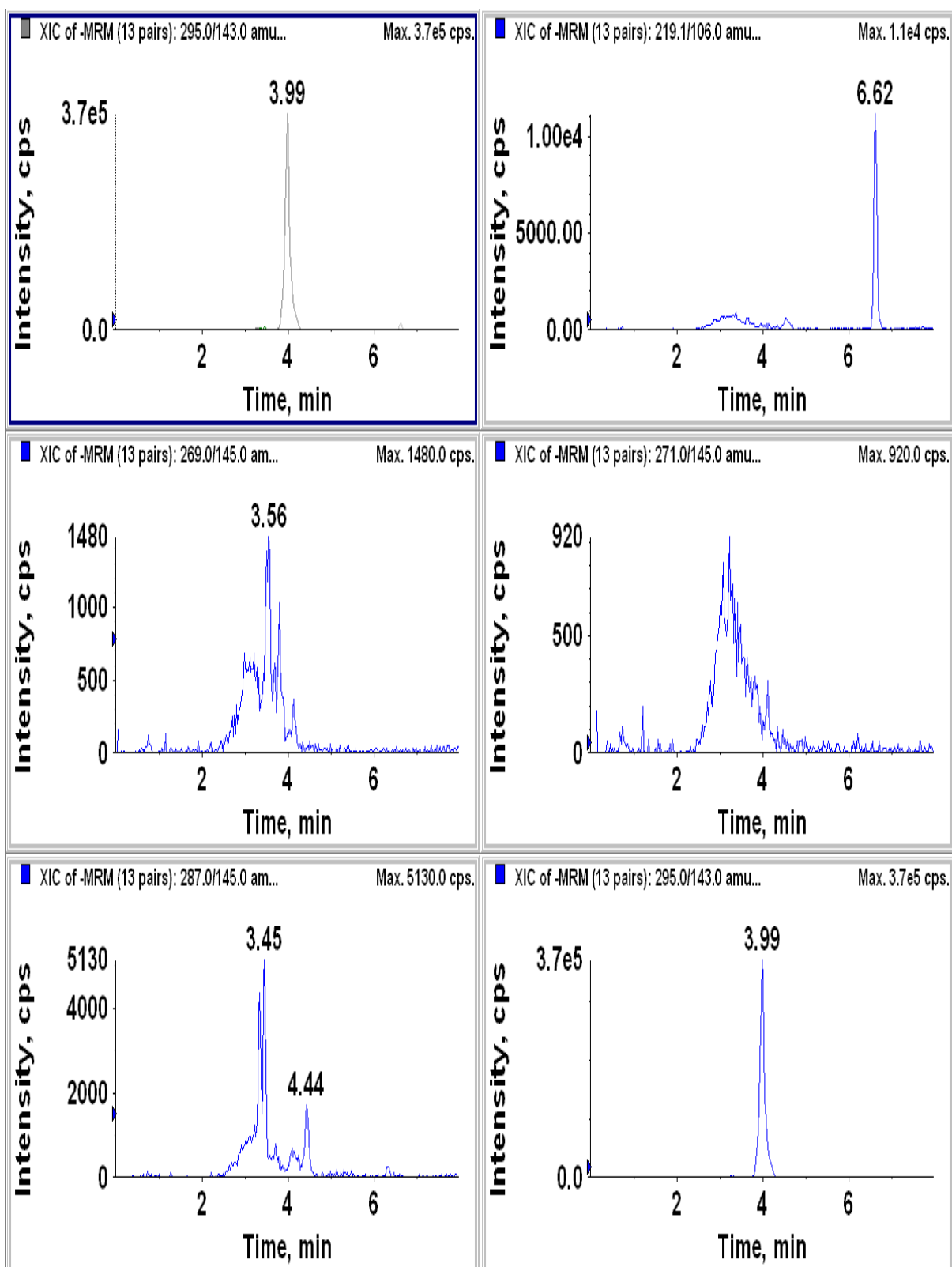
ANEXO 15-Cromatogramas da amostra de Campinas bruta-27/08/07 (CB2).

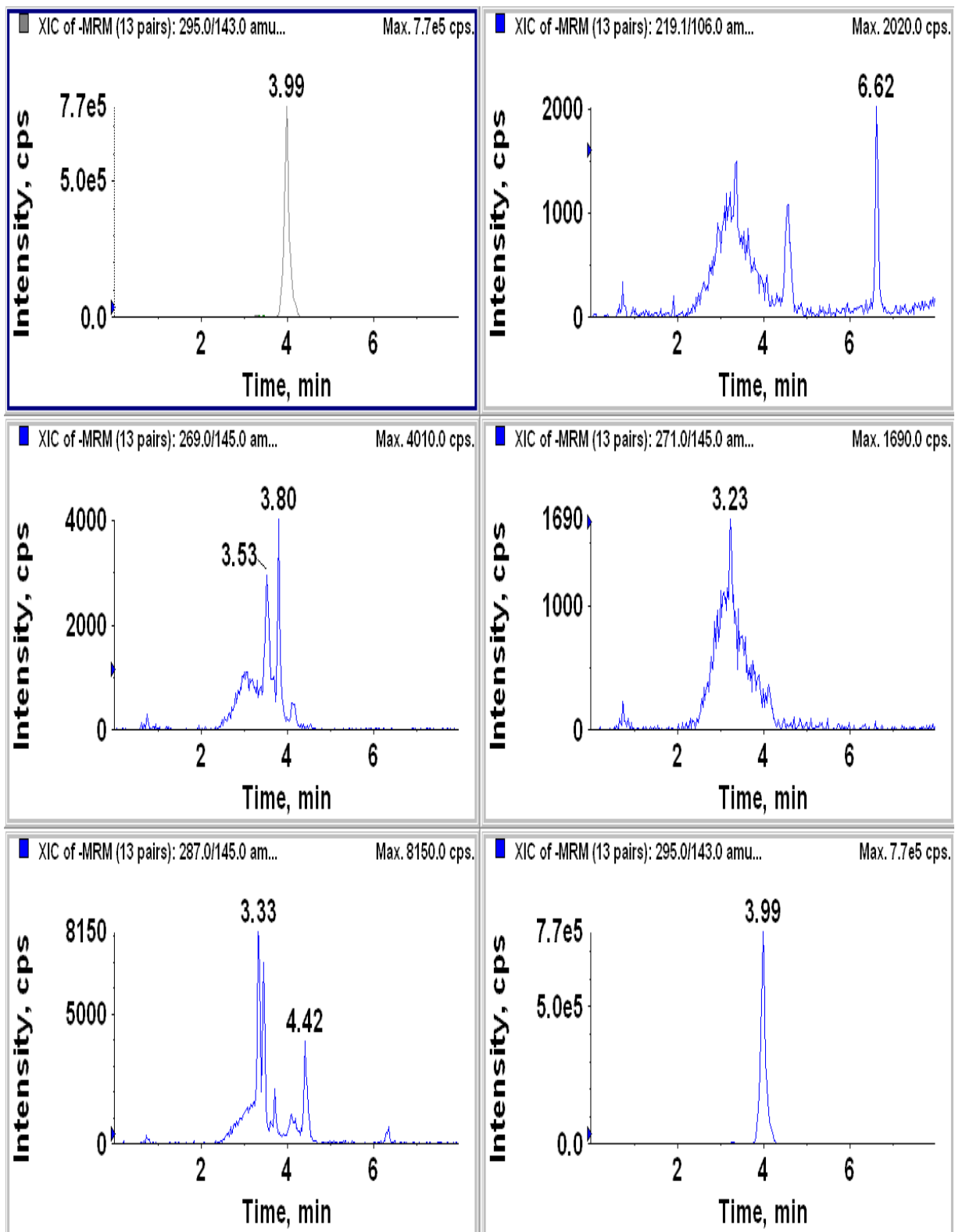
ANEXOS 16-Cromatogramas da amostra de Campinas Tratada-27/08/07 (CT1).

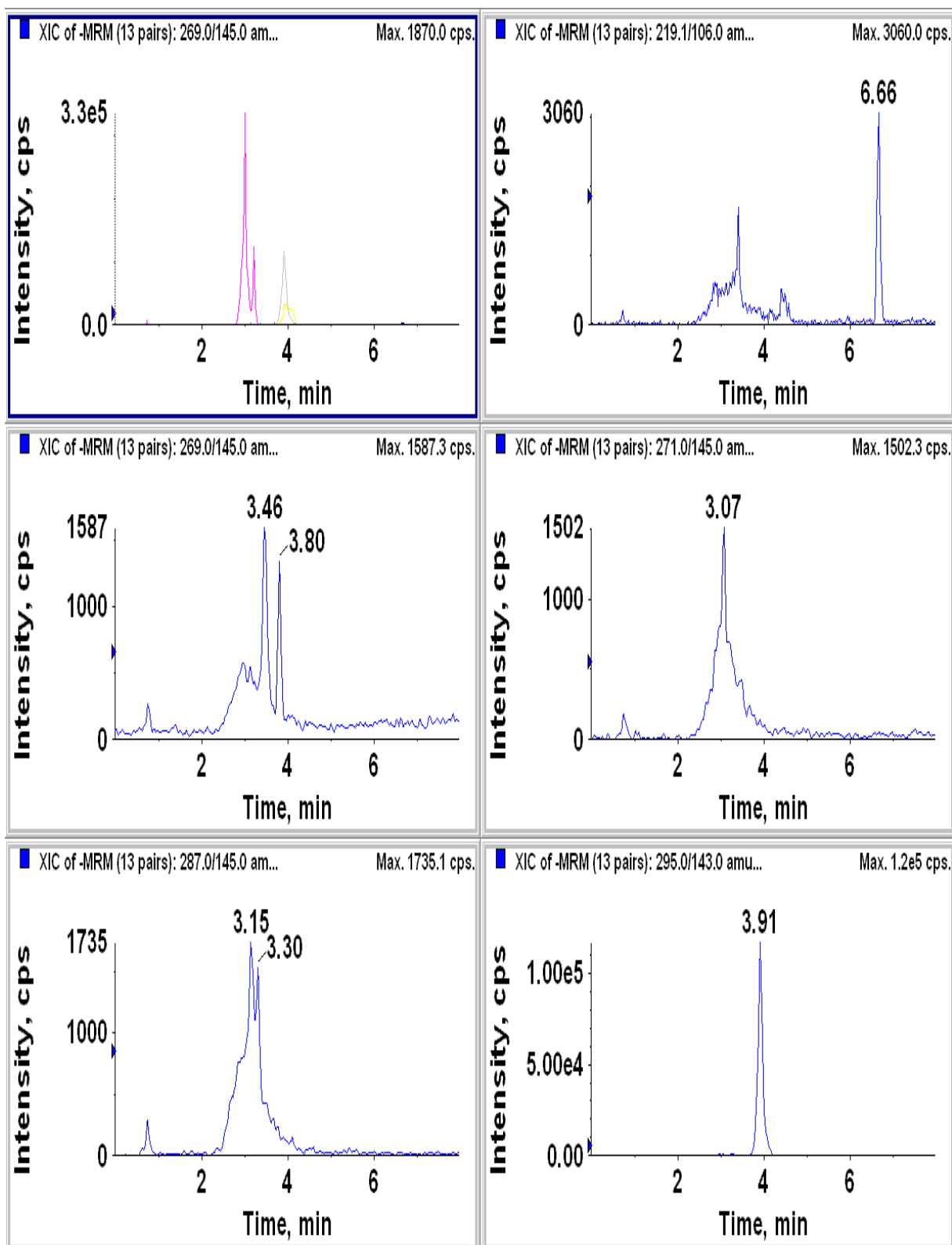
ANEXO 17-Cromatogramas da amostra de Campinas Tratada-27/08/07 (CT2).

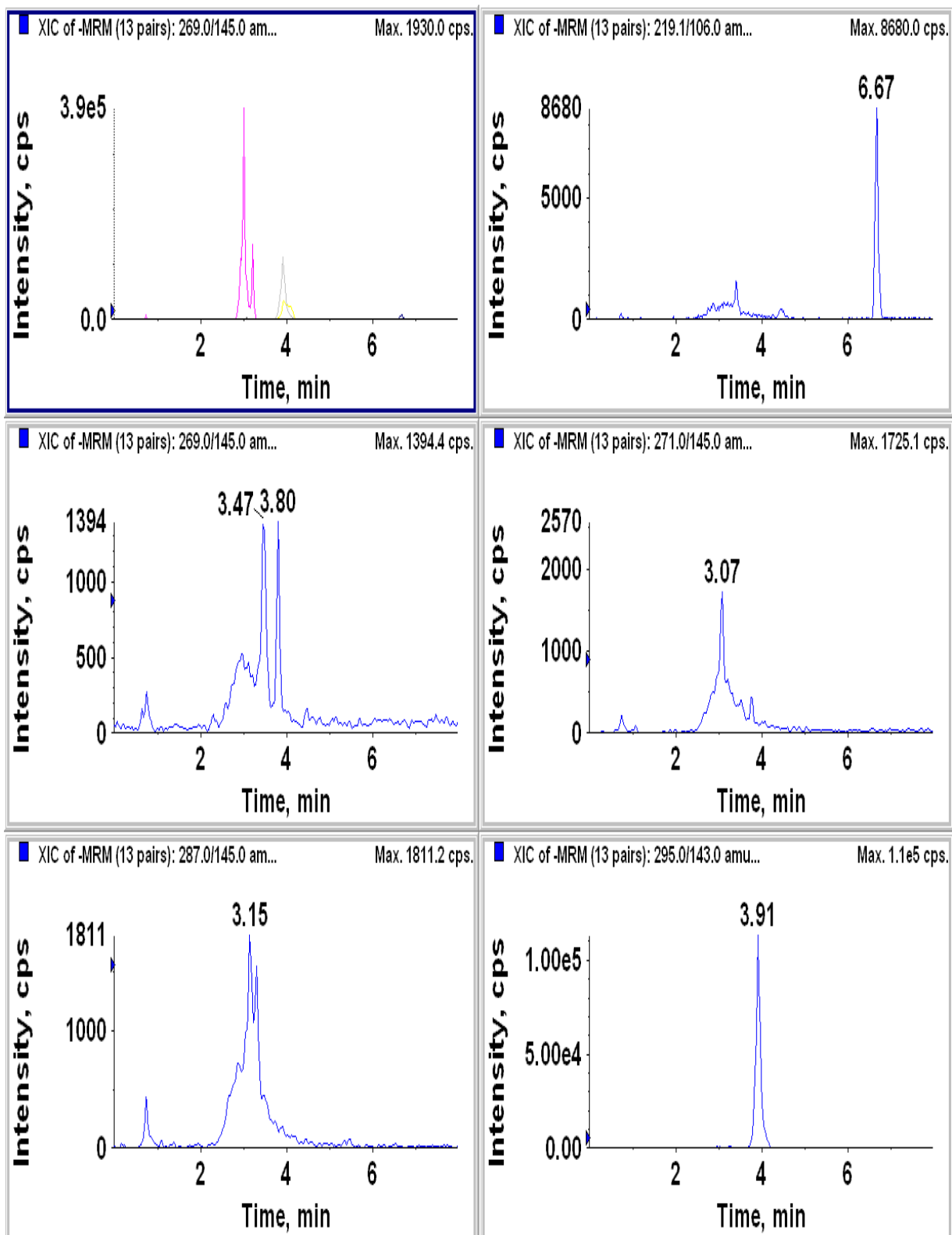
ANEXO 18-Cromatogramas da amostra de Sumaré bruta-27/08/07 (SB1).

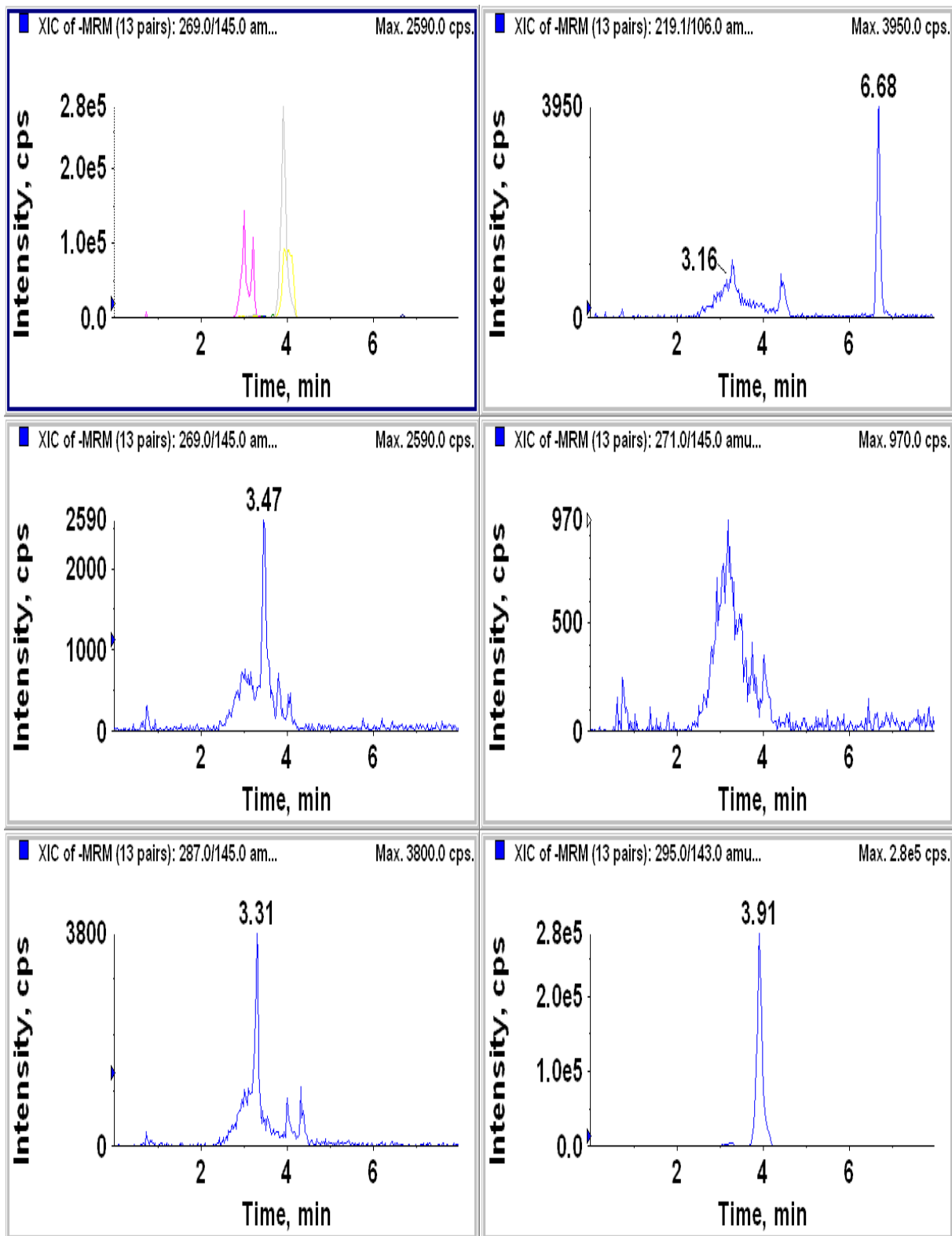
ANEXO 19-Cromatogramas da amostra de Sumaré bruta-27/08/07 (SB2).

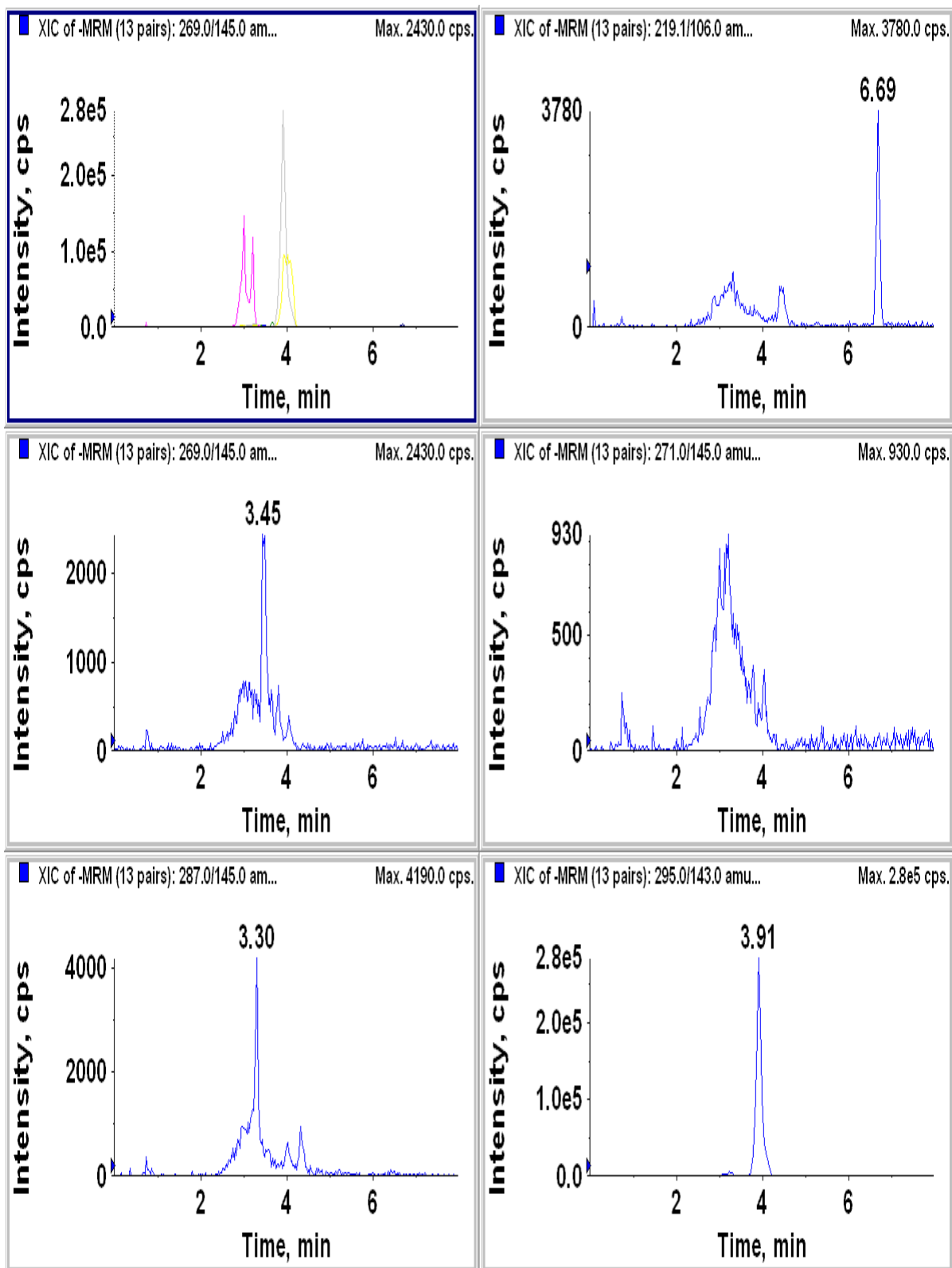
ANEXO 20-Cromatogramas da amostra de Sumaré tratada-27/08/07 (ST1).

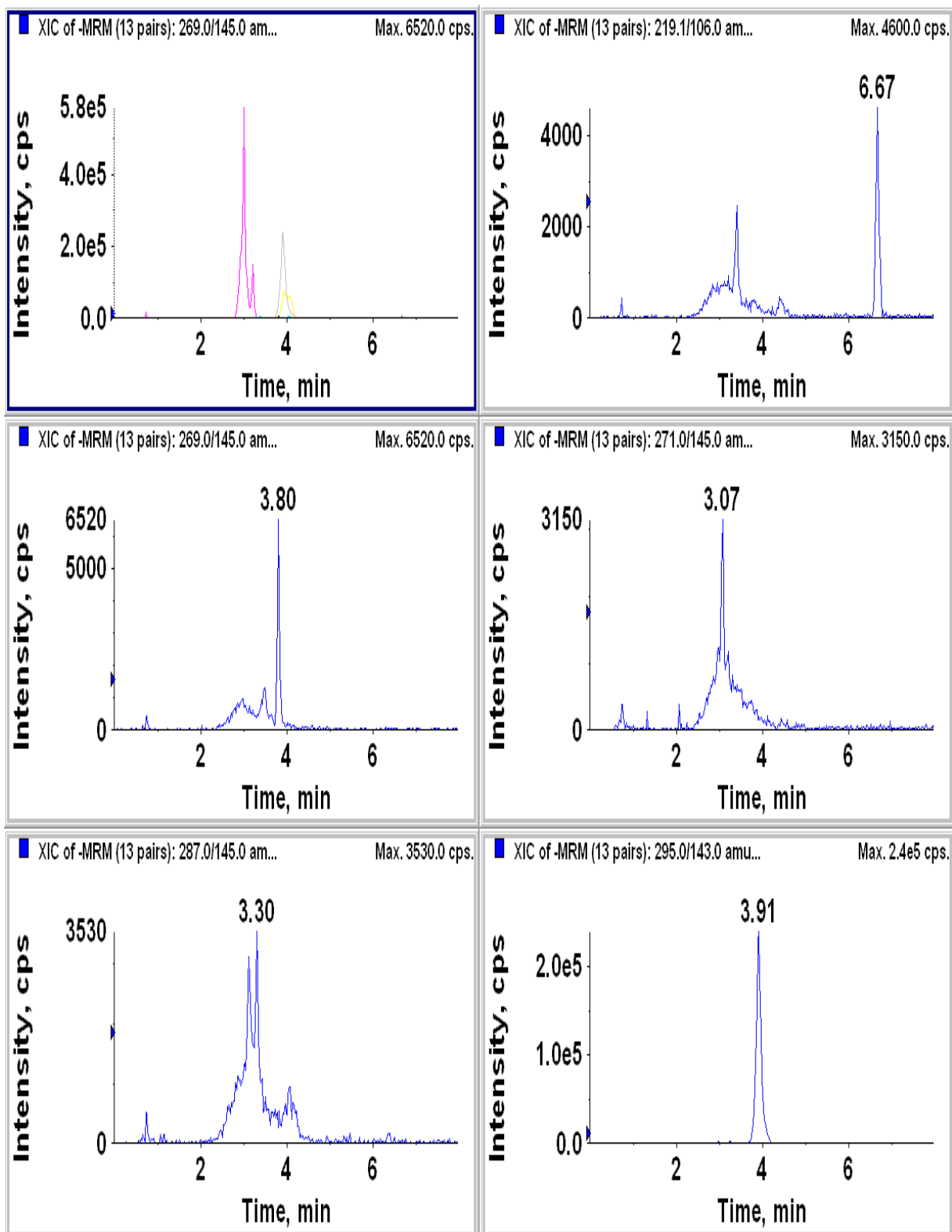
ANEXO 21-Cromatogramas da amostra de Sumaré trata-27/08/07 (ST2)

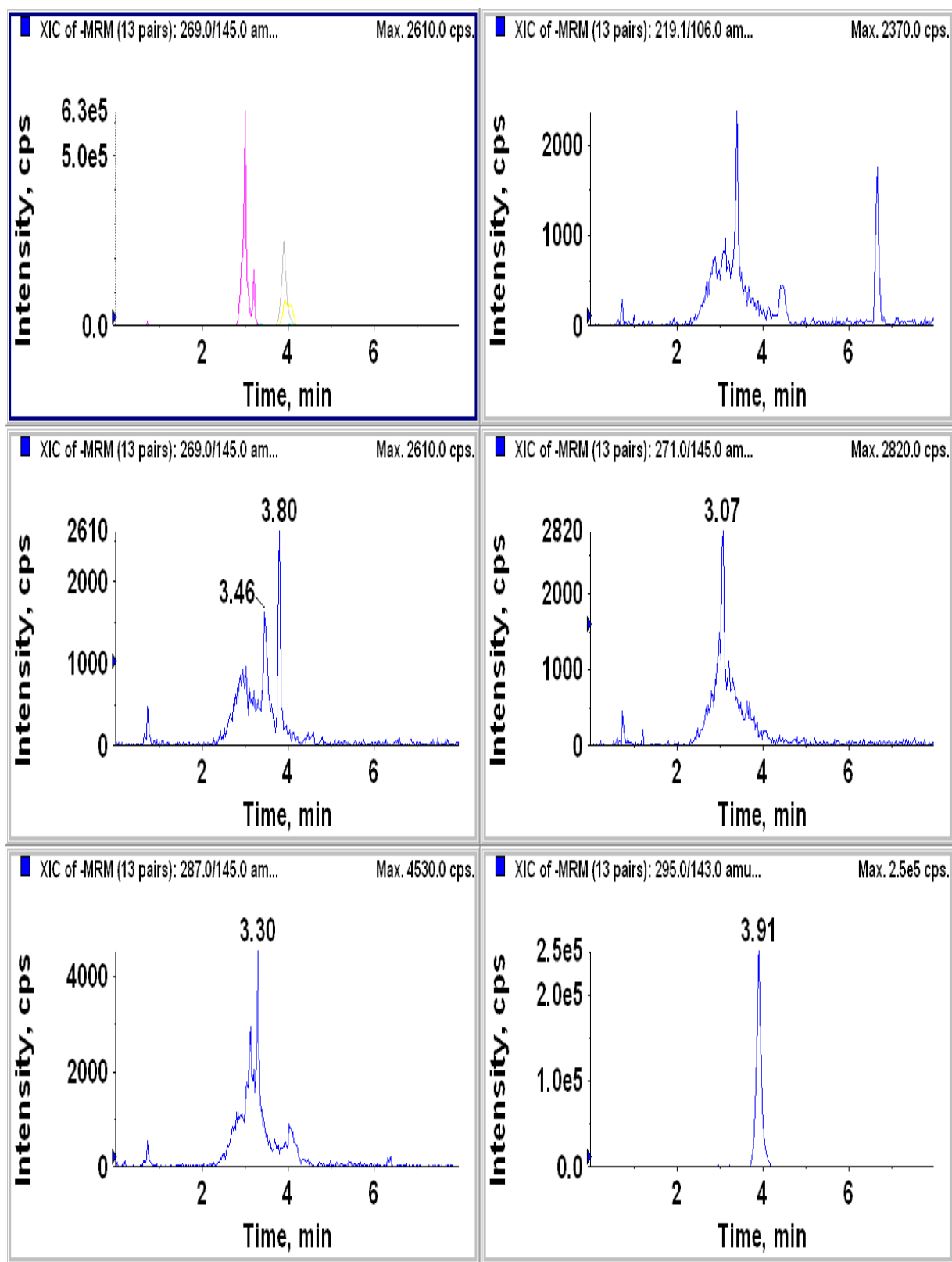
ANEXO 22-Cromatogramas da amostra de Campinas bruta-03/09/07 (CB1)

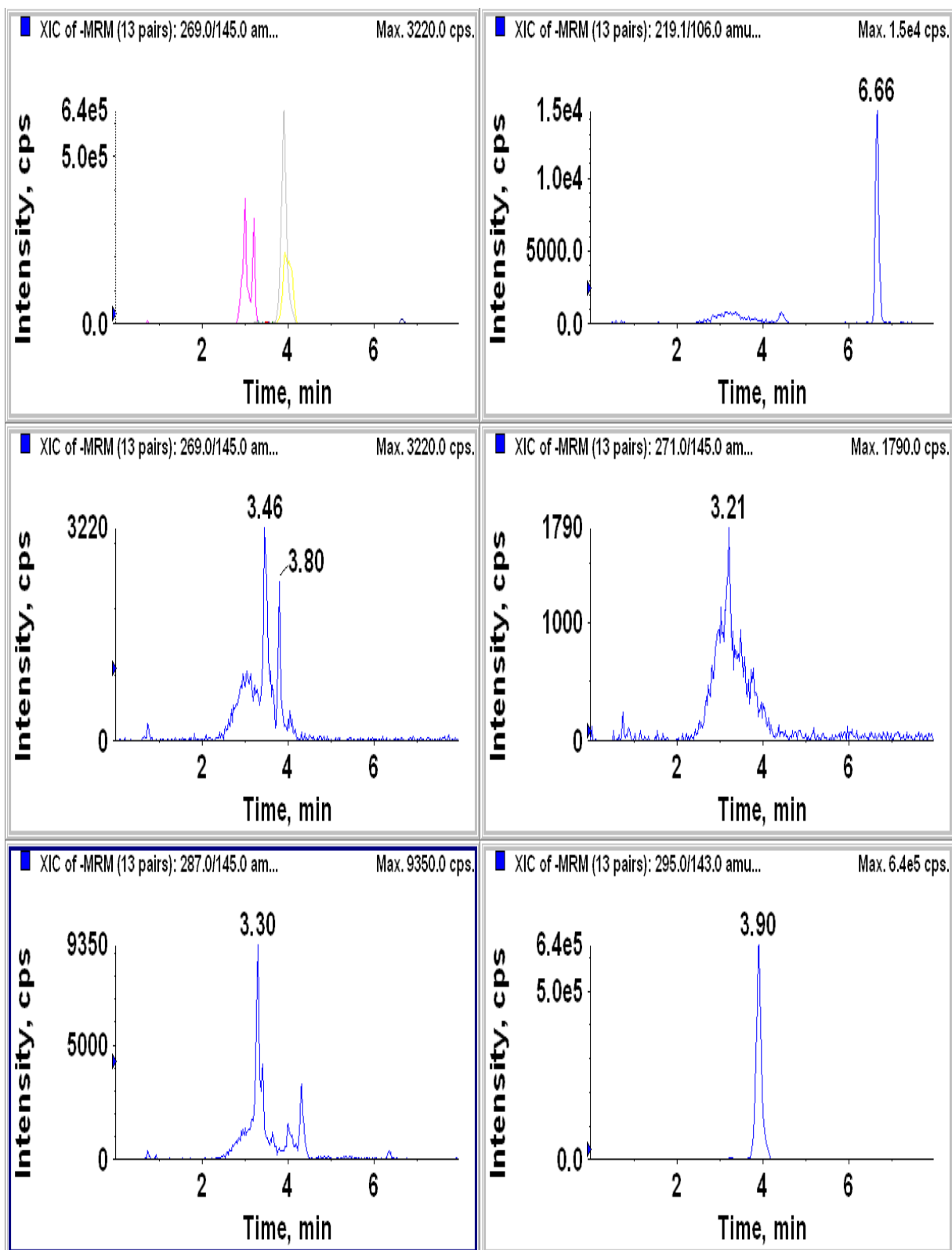
ANEXO 23-Cromatogramas da amostra de Campinas bruta-03/09/07 (CB2)

ANEXO 24-Cromatogramas da amostra de Campinas tratada-03/09/07 (CT1)

ANEXO 25-Cromatogramas da amostra de Campinas tratada-03/09/07 (CT2).

ANEXO 26-Cromatogramas da amostra de Sumaré bruta-03/09/07 (SB1)

ANEXO 27-Cromatogramas da amostra de Sumaré bruta-03/09/07 (SB2).

ANEXO 28-Cromatogramas da amostra de Sumaré tratada-03/09/07 (ST1).

ANEXO 29-Cromatogramas da amostra de Sumaré tratada-03/09/07 (ST2).