**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

KÉLEN SIQUEIRA CHAVES

**Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17α -
etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul**

Lorena - SP

2016

KÉLEN SIQUEIRA CHAVES

**Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol,
17 α -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul**

Dissertação apresentada a Escola de Engenharia
de Lorena, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Dr. Flávio Teixeira da Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena-SP

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Chaves, Kélen Siqueira

Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol A, B-estradiol, 17a-etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul / Kélen Siqueira Chaves; orientador Flávio Teixeira da Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2016.
134 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientador: Flávio Teixeira da Silva

1. Desreguladores endócrinos. 2. Rio paraíba do sul. 3. Micropoluentes. 4. Cromatografia líquida. 5. Extração em fase sólida. I. Título. II. Silva, Flávio Teixeira da, orient.

*Com muito amor dedico esse
trabalho aos meus pais e ao Dan!*

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Flávio Teixeira da Silva, pela ajuda e amizade, principalmente nos momentos em que, algumas vezes, acreditou mais em meu trabalho que eu mesma;

Ao professor Flávio Soares Silva, que me ajudou nas dúvidas referentes ao desenvolvimento do método e se mostrou sempre disponível;

À todos os professores que tive a oportunidade de conhecer e aprender e que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho;

À CAPES, pela bolsa de mestrado;

Ao FEHIDRO, pelo suporte financeiro à pesquisa;

À Lucinha, por sua amizade, companheirismo e dedicação, por ter me ajudado de todas as formas possíveis, muito obrigada;

Ao Clebinho, por me ajudar nas coletas, nas análises e por sempre tornar os dias no laboratório mais divertidos;

Ao Zé Moreira e Cobrinha, por serem sempre prestativos;

Ao “Seu Dito” por ter nos conduzido pelo Rio Paraíba do Sul e pela sua imensa alegria em nos ajudar;

A toda família ecotox, doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica, que tive o prazer de conviver esses dois anos, pela amizade, ajuda, troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração, muito obrigada, vou guardar boas recordações de todos vocês;

Ao Daniel, pela ajuda na estatística;

Ao Dan, que me trouxe paz e apoio nos momentos que mais precisei, sem você não teria conseguido;

A toda minha família, por estarem sempre do meu lado, amo vocês!

RESUMO

CHAVES, K. S. **Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul.** 2015. 133 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

O Rio Paraíba do Sul é um dos mais importantes mananciais da região sudeste, mas devido ao aumento da população e ao crescimento industrial da região, o rio vem sofrendo grandes alterações de natureza antropológica muito em parte devido a elevada carga de descarte de esgoto doméstico e industrial. Assim, é de se esperar, que o rio receba grande concentração de contaminantes tanto em matéria orgânica como também outros contaminantes, como os microcontaminantes. Dentre esses compostos se incluem os fármacos, produtos de higiene pessoal, pesticidas e os Desreguladores Endócrinos (DEs), que é uma classe de substância que vem sendo muito investigada atualmente devido aos efeitos causados em organismos expostos e que chegam ao ambiente principalmente através do descarte de efluente doméstico e industrial. Os DEs são substâncias exógenas, que podem afetar negativamente o funcionamento do sistema endócrino levando a alterações no crescimento, desenvolvimento e reprodução. Essas substâncias vêm sendo detectadas em todo o mundo em pequenas concentrações (μg e ng), mas mesmo assim possuem capacidade de interagir com organismos expostos e causar algum tipo de efeito. Neste trabalho foram analisadas amostras de água superficial, a 0,60 m e 1,20 m de profundidade, na cidade de Aparecida no Estado de São Paulo, em um ponto próximo a captação de água para abastecimento público, sendo este mesmo ponto a aproximadamente 50 m a jusante do descarte de esgoto do Santuário Nacional e de bairros próximos. As amostras foram analisadas pelo método de HPLC-UV que foi desenvolvido para análise dos DEs Bisfenol-A (BFA), β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e Estrona (E1). O método foi validado e se mostrou adequado. Foram realizados estudos das variáveis precipitação pluviométrica, radiação ultravioleta (UV), pH, temperatura da água e número de visitantes presentes na cidade, em função da concentração dos DEs encontrados nas amostras. Os resultados mostraram a presença dos analitos de interesse em concentrações elevadas. O BFA foi efetivamente detectado em 16,7% das amostras em concentrações que variaram de $0,032 \pm 0,009$ a $0,088 \pm 0,06 \mu\text{g.L}^{-1}$. O E2 foi efetivamente detectado em 39,2% das amostras com valores variando de $0,009 \pm 0,002$ a $0,40 \pm 0,08 \mu\text{g.L}^{-1}$. O EE2 foi efetivamente detectado em 45,1% das amostras com valores variando de $0,07 \pm 0,01$ a $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$. O E1 foi efetivamente detectado em 90,2% das amostras com valores variando de $0,107 \pm 0,08$ a $0,91 \pm 0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$. A análise estatística dos resultados mostrou que somente parte das variáveis estudadas apresentou correlação. Foram estabelecidas correlações entre índice pluviométrico e BFA, temperatura e concentrações de E1 e EE2, pH e concentrações de BFA, E1 e EE2 e número de visitantes com EE2. As demais variáveis não apresentaram nenhuma correlação.

Palavras-chave: Desreguladores Endócrinos. Rio Paraíba do Sul. Micropoluentes. Cromatografia Líquida. Extração Fase-sólida.

ABSTRACT

CHAVES, K. S. **Determination of Disruptors Endocrine Bisphenol-A, β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol and estrone of the Paraíba do Sul River**. 2015. 133 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

The Paraíba do Sul River is one of the most important water sources in the Brazilian Southeast, but due to increasing population and industrial growth in the region, the river has undergone great anthropological changes mostly due to high domestic sewage disposal and industrial charges. Thus, it is expected that the river receives large concentration of contaminants both in organic matter as well as other contaminants, such as microcontaminants. Among these compounds include pharmaceuticals, personal care products, pesticides and Endocrine Disruptors (EDs), which is a class of substances that has been widely currently investigated due to the effects in exposed organisms and reach the environment mainly through the disposal domestic and industrial effluent. The EDs are exogenous substances that can adversely affect the functioning of the endocrine system leading to changes in growth, development and reproduction. These substances have been detected worldwide in small concentrations (μg and ng), but yet have the capacity to interact with exposed organisms and cause some kind of effect. In the present study the river water samples were collected at surface, at 0.60 m and 1.20 m deep in the city of Aparecida in São Paulo, at a point close to abstraction of water for public supply, which is also located about 50 m downstream of the sewage disposal of the National Shrine and nearby neighborhoods. The samples were analyzed by HPLC-UV method developed for analysis of EDs Bisphenol A (BFA), β -estradiol (E2), 17 α -ethinylestradiol (EE2), and estrone (E1). The method was validated and proved adequate. Studies have been conducted considering as variables the rainfall, ultraviolet radiation (UV), pH, water temperature and number of visitors present in the city, depending on the concentration of EDs found in the samples. The results showed the presence of the analytes at high concentrations. The BFA was effectively detected in 16.7% of the samples at concentrations ranging from 0.032 ± 0.009 to $0.088 \pm 0.06 \mu\text{g.L}^{-1}$. E2 was effectively detected in 39.2% of the samples with values ranging from 0.009 ± 0.002 to $0.40 \pm 0.08 \mu\text{g.L}^{-1}$. The EE2 was effectively detected in 45.1% of the samples with values ranging from 0.07 ± 0.01 to $0.6 \pm 0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$. The E1 was effectively detected in 90.2% of the samples with values ranging from 0.107 ± 0.08 to $0.91 \pm 0.07 \mu\text{g.L}^{-1}$. Statistical analysis of the results showed that only part of the variables correlated. Correlations have been established between rainfall and BFA, temperature and concentrations of E1 and EE2, pH and concentrations of BFA, E1 and EE2 and number of visitors with EE2. The other variables did not show any correlation.

Keywords: Endocrine Disruptors. Paraíba do Sul River. Micropollutants. Liquid Chromatography. Extraction Phase-solid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da Bacia do Rio Paraíba do Sul. O retângulo mostra a área de estudo.	20
Figura 2: Estrutura de Lewis dos principais hormônios estrogênicos.	31
Figura 3: Diferentes rotas de exposição dos Desreguladores Endócrino.	35
Figura 4: Conjunto de glândulas que compõem o sistema endócrino.	36
Figura 5: Disfunções Endócrinas.	40
Figura 6: Representação esquemática simplificada da sequência de processos que leva à síntese do biomarcador de exposição VTG em peixes machos.	47
Figura 7: Esquema simplificado do tratamento biológico de lodo ativado.	52
Figura 8: Variantes do sistema de biorreatores de membrana.	54
Figura 9: Classificação dos diferentes processos de filtração dos biorreatores de membrana.	55
Figura 10: Cadeia orgânica do tipo C-18 imobilizada na superfície de sílica.	63
Figura 11: Etapas de extração em fase sólida: A) Condicionamento do cartucho; B) Passagem da amostra; C) Lavagem dos cartucho para retirada dos interferentes e D) Eluição dos analitos.	65
Figura 12: Exemplo de diferentes sorventes que são utilizados para extração em fase sólida.	66
Figura 13: Fluxograma para avaliação das propriedades da "desregulação endócrina" para a saúde humana.	73
Figura 14: Percentual de municípios que coletam e tratam esgoto, por Grandes Regiões-2008.	75
Figura 15: Sistema de Extração em Fase Sólida (EFS) utilizado para a validação do método.	80
Figura 16: Esquema simplificado utilizado para a validação do método de extração.	81
Figura 17: Fotografias da região do ponto de coleta das amostras. 1- plataforma onde é feita a captação de água para abastecimento. A seta marca o ponto de descarte de efluente. 2- ponto de descarte de efluente no Rio Paraíba.	83
Figura 18: Foto da garrafa de Von Dorn utilizada na coleta.	83
Figura 19: Imagem do sistema de extração utilizado para percolar as amostras em cartucho C18.	84
Figura 20: Cromatogramas obtidos para a separação dos padrões dos BFA, E2, EE2 e E1. A- cromatograma em 230nm; B- cromatograma em 280 nm.	87
Figura 21: Curva de calibração obtida na determinação de BFA.	88
Figura 22: Recuperação e coeficiente de variação (CV).	89
Figura 23: Exemplo de cromatogramas dos testes de recuperação da extração em fase sólida. A: Cromatograma de água subterrânea fortificada no nível baixo e B: Cromatograma de água subterrânea sem fortificação.	90
Figura 24: Seletividade. A- água superficial. B- água subterrânea.	90
Figura 25: Variação das médias das concentrações dos analitos em diferentes profundidades. (1)= amostras de água da superfície, (2)= amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade, (3)= amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade.	93
Figura 26: Exemplo dos cromatogramas obtidos nas coletas. A: coleta superficial (13-jun); B: coleta a 0,60 m de profundidade (13-abr); C: coleta a 1,20 m de profundidade (26-jun).	93
Figura 27: Cromatograma exemplo mostrando os possíveis produtos de degradação do BFA.	96
Figura 28: Valores de pH das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2**= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.	102

Figura 29: Valores de condutividade das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2**= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.	102
Figura 30: Valores de temperatura das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2**= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.	103
Figura 31: Valores de turbidez das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2**= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.	104
Figura 32: Precipitação pluviométrica acumulada e a média histórica da cidade de Aparecida referente aos meses que coletas as amostras de água no Rio Paraíba do Sul em 2015.	104
Figura 33: Variação do índice de radiação UV médio na cidade de Aparecida nos meses que foram realizadas as coletas no Rio Paraíba do Sul.	105
Figura 34: Ordenação com base na Análise dos Componentes Principais (ACP) de correlação das variáveis em água coletada na superfície.	107
Figura 35: Ordenação com base na Análise dos Componentes Principais (ACP) de correlação das variáveis em amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade.	109
Figura 36: Ordenação com base na Análise dos Componentes Principais (ACP) de correlação das variáveis em amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de compostos Desreguladores Endócrinos.....	30
Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos Desreguladores Endócrinos de interesse Bisfenol-A, β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e Estrona.....	51
Tabela 3: Potencial de oxidação para várias substâncias oxidantes.....	57
Tabela 4: Concentrações dos sete pontos da curva analítica (mg.L ⁻¹) construída para a validação do método cromatográfico para a determinação de BFA, E2, EE2 e E1.	79
Tabela 5: Condicionamentos utilizados para os testes de extração em fase sólida com água fortificada destilada.....	80
Tabela 6: Concentrações de fortificação utilizadas para os estudos de exatidão e precisão do método.....	82
Tabela 7: Intervalo de trabalho (mg.L ⁻¹), limite de detecção (mg.L ⁻¹), limite de quantificação (mg.L ⁻¹) e coeficiente de correlação das curvas de calibração dos estrogênios em 230 e 280 nm. Legenda: IT ₂₃₀ = intervalo de trabalho em 230 nm, LD ₂₃₀ = limite de detecção em 230 nm, LQ ₂₃₀ = limite de quantificação em 230 nm, r ² ₂₃₀ = coeficiente de correlação em 230 nm, IT ₂₈₀ = intervalo de trabalho em 280 nm, LD ₂₈₀ = limite de detecção em 280 nm, LQ ₂₈₀ = limite de quantificação em 280 nm, r ² ₂₈₀ = coeficiente de correlação em 280 nm.	87
Tabela 8: Resultados obtidos para os testes de recuperação da extração em fase sólida, utilizando quatro diferentes métodos. CV= coeficiente de variação.....	88
Tabela 9: Concentrações determinadas de BFA, E2, EE2 e E1 em amostras de água do Rio Paraíba do Sul coletadas na cidade de Aparecida em diferentes profundidades: 1= superficial, 2= 0,60 m e 3 1,20 m. LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação e ND- não detectado.....	92
Tabela 10: Estimativa do número de visitantes por fim de semana dos meses de abril, maio, junho e julho de 2015.....	105
Tabela 11: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis das amostras coletadas na superfície, com relações significativas no nível de 5% (p<0,05). BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.....	107
Tabela 12: Contribuição de cada eixo na explicação do arranjo formado na Análise dos Componentes Principais (ACP) com base numa matriz de correlações, das variáveis analisadas em amostras água coletadas na superfície.....	108
Tabela 13: Correlação das variáveis analisadas com os componentes principais (eixos) 1, 2 e 3 de uma ACP com base numa matriz de correlações de amostras coletadas na superfície. Em negrito os valores que mais influenciaram a formação dos respectivos arranjos. BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.....	108
Tabela 14: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis das amostras coletadas a 0,60 m de profundidade, com relações significativas no nível de 5% (p<0,05). BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.....	109
Tabela 15: Contribuição de cada eixo na explicação do arranjo formado na Análise dos Componentes Principais (ACP) com base numa matriz de correlações, das variáveis analisadas em amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade.	110
Tabela 16: Correlação das variáveis analisadas com os componentes principais (eixos) 1, 2 e 3 de uma ACP com base numa matriz de correlações. Em negrito os valores que mais influenciaram a formação dos respectivos arranjos das amostras coletadas a 0,60 m de profundidade. BFA=	

Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.	110
Tabela 17: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis das amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade, com relações significativas no nível de 5% ($p < 0,05$). Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.	111
Tabela 18: Contribuição de cada eixo na explicação do arranjo formado na Análise dos Componentes Principais (ACP) com base numa matriz de correlações, das variáveis analisadas em amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade.	112
Tabela 19: Correlação das variáveis analisadas com os componentes principais (eixos) 1, 2 e 3 de uma ACP com base numa matriz de correlações das amostras coletadas a 1,20 m de profundidade. Em negrito os valores que mais influenciaram a formação dos respectivos arranjos. BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.	112

SUMÁRIO

Conteúdo

1	Introdução	17
1.1.	Características Sanitárias da Região em Estudo	20
2	Objetivos	23
2.1.	Objetivo Geral	23
2.2.	Objetivos Específicos	23
3	Revisão Bibliográfica	24
3.1.	Desreguladores Endócrinos (DEs)	25
3.2.	Vias de Contaminação por Desreguladores Endócrinos	32
3.3.	Ação dos Desreguladores Endócrinos	35
3.3.1.	Sistema Endócrino	35
3.3.2.	Mecanismos de Ação	38
3.4.	Ecotoxicidade dos Desreguladores Endócrinos	42
3.5.	Tecnologias Utilizadas para Degradação e Remoção de Desreguladores Endócrinos em Estações de Tratamento de Água e Esgoto	50
3.5.1.	Lodo Ativado	52
3.5.2.	Biorreatores de Membrana (BRMs)	53
3.5.3.	Processos Oxidativos Avançados	56
3.5.4.	Adsorção em Carvão Ativado	60
3.6.	Análise dos Desreguladores Endócrinos	61
3.6.1.	Técnicas Cromatográficas	61
3.6.2.	Extração Fase Sólida	63
3.7.	Validação de Métodos Cromatográficos	67
3.8.	Legislação aplicada a Desreguladores Endócrinos	71
4	Materiais e Métodos	77
4.1.	Materiais	77
4.2.	Equipamentos	77
4.3.	Reagentes e Padrões	77
4.4.	Validação do Método para Determinação dos DEs por HPLC-UV	78
4.5.	Coleta das Amostras	82
4.6.	Análises Estatísticas	85
5	Resultados e Discussões	86

5.1.	Validação do Método Cromatográfico para Determinação dos DEs.....	86
5.2.	Determinação de DEs no Rio Paraíba do Sul nas cidades de Lorena e Aparecida.....	91
5.3.	Trabalhos Relacionados.....	100
5.4.	Caracterização das amostras e do ambiente no entorno do ponto de coleta	101
	Fonte: Arquivo pessoal.....	105
5.5.	Análise Estatística	106
5.5.1.	Coefficientes de Correlação de Spearman e Análise dos Componentes Principais	
(ACP)	106	
6	Conclusões.....	121
	Referências	123

1 Introdução

O Rio Paraíba do Sul nasce na Serra da Bocaina, no Estado de São Paulo, e deságua no norte fluminense no Estado do Rio de Janeiro, percorrendo uma distância de 1.137 km de sua nascente até sua foz (SUPMED, 2010). É formado pela união dos Rios Paraibuna e Paraitinga. Possui uma área de drenagem próxima de 55.500 km² e se localiza na Região Sudeste banhando os Estados de São Paulo (13.900 km²), Minas Gerais (20.700 km²) e Rio de Janeiro (20.900 km²) (COPPETEC, 2006).

A Bacia do Rio Paraíba do Sul é limitada ao Norte pelas bacias do Rio Grande e do Rio Doce e pelas Serras da Mantiqueira, Caparaó e Santo Eduardo. A nordeste é limitado pelo Rio Itabapoana. Ao Sul o limite é formado pela Serra dos Órgãos e pelos trechos paulista e fluminense da Serra do Mar. A Oeste pela bacia do Rio Tietê, da qual é separada por meio de diversas ramificações da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira. Ela drena uma das regiões mais desenvolvidas do país, passando pelo Estado de São Paulo na região do Vale do Paraíba, dirigindo-se ao Estado de Minas Gerais na região da Zona da Mata e finalmente chegando ao Rio Janeiro onde banha metade do estado. Em toda essa extensão, há 180 municípios, 36 dos quais são parcialmente inseridos na bacia (COPPETEC, 2006). Possui um agregado de problemas ambientais que se acumulam e crescem ano após ano refletindo na qualidade da água para o abastecimento e vida da população.

O processo de degradação ambiental na bacia do Rio Paraíba do Sul se iniciou no século XVII, com o início do desmatamento florestal para a plantação de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, no Vale do Paraíba e no Estado do Rio de Janeiro, na região de Campo de Goitacazes. O desmatamento se intensificou nos séculos XVIII e XIX, devido ao início da segunda grande monocultura do país, o café. Em pouco tempo as plantações substituíram as florestas naturais ao longo do Vale do Paraíba. No final do século XIX houve um colapso da cultura cafeeira com a abolição da escravidão, porém a redução da área com cobertura vegetal já era grande e vários problemas relacionados ao desmatamento como assoreamento, erosão e perda da fertilidade do solo já eram notados. As plantações de café deram origem às pastagens, sendo que na primeira metade do século XX, as principais atividades econômicas se baseavam apenas em atividades agropecuárias. O

desenvolvimento industrial e a expansão urbana somente se iniciaram a partir do ano de 1940 (SUPMED, 2010).

As florestas tropicais que ocupavam grande parte da bacia, antes da expansão do cultivo de café, foram reduzidas 11% de seu total, compondo os remanescentes isolados, se concentrando em terrenos montanhosos como na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira. Apesar da área florestal da bacia do Rio Paraíba do Sul estar extremamente reduzida, sua degradação continua, sendo ela pela exploração de madeira ou incêndios ambientais e criminosos (COPPETEC, 2006).

Com o desenvolvimento, a degradação da bacia do Rio Paraíba do Sul está aumentando, enquanto a qualidade e a disponibilidade de suas águas vem diminuindo (COPPETEC, 2006).

Atualmente as principais fontes de poluição do Rio Paraíba do Sul são os esgotos domésticos e industriais. O primeiro é que mais contribui para a contaminação, uma vez que os sistemas municipais de tratamento de esgoto, quando existentes, são ineficientes. Em 2005, dos 34 municípios que compunham a porção paulista da bacia do Rio Paraíba do Sul, apenas 19 possuíam algum tipo de tratamento (REIS, 2005). Segundo a COPPETEC (2006), em 2006, 82,02% da população da região da bacia possuíam sistema de coleta de esgoto e apenas 17,6% possuíam sistemas de tratamento de efluentes domésticos. Assim sendo, fica evidente o grau de exposição a doenças infectocontagiosas a que a população está exposta e o grau da carga orgânica que a bacia recebe diariamente, diminuindo em muito como já dito, a qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul.

Com o notável crescimento industrial na região da bacia do Rio Paraíba do Sul, há de se esperar que os resíduos gerados por essas indústrias também contribuam de forma significativa para a poluição do rio. Mesmo com o licenciamento ambiental e o enquadramento das atividades exercidas pela indústria na Legislação e Normas Ambientais o monitoramento e controle de efluentes por órgãos vigentes são insuficientes (SUPMED, 2010).

Com o crescimento populacional e industrial na região da bacia do Rio Paraíba do Sul, o aumento pela demanda de água tem aumentado e, conseqüentemente, o rio vem emitindo os primeiros sinais de esgotamento dos recursos hídricos e da capacidade de recuperação das reservas, tanto em termos quantitativos como qualitativos (REIS, 2005).

A baixa qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul parece estar relacionada em maior grau à poluição do que a quantidade de água disponível. Entretanto, existem indícios de que a queda na quantidade de água em alguns trechos do rio prejudica o abastecimento e a irrigação de lavouras em áreas mais intensamente desmatadas (COPPETEC, 2003).

Além disso, há ainda o problema das hidrelétricas e barragens que dividem o rio em compartimentos, ocasionando alterações nas características ecológicas, bem como causando problemas sociais. As barragens impõem um obstáculo físico que altera os habitats, diminuindo a vazão original, criando regime de escoamento irregular, alterando a qualidade da água e aumentando a vulnerabilidade das comunidades de peixes. Limitam a livre movimentação de espécies nativas migratórias para montante ou jusante do obstáculo, reduzindo ou impedindo o seu acesso a áreas fundamentais para o seu ciclo de vida. Tal fragmentação populacional causa desequilíbrio na estrutura das populações e, provoca o desaparecimento de espécies migratórias (SUPMED, 2010).

A construção de usinas na bacia data desde 1908, com a primeira usina construída em Itamarati de Minas no Estado de Minas Gerais. Além disso, em 1950 foi executado o maior projeto de transposição de água entre bacias na América do Sul. O Rio Paraíba teve suas águas transferidas por uma série de barragens em afluentes para a bacia do Rio Guandu. O benefício provavelmente da geração de energia se deu na bacia do Rio Guandu, porém os impactos causados pelos reservatórios e estruturas hidráulicas, para que essa transposição ocorresse, estão espalhados pela bacia do Rio Paraíba como também no Rio Pirai, um de seus afluentes (CEIVAP, 2009).

Para atender a crescente demanda de energia das regiões metropolitanas de São Paulo e Rio de Janeiro, foram instaladas novas barragens e usinas ao longo do Rio Paraíba do Sul e seus afluentes. Um relatório de Avaliação Ambiental Integrada da bacia do Rio Paraíba do Sul (AAI), produzido pela Empresa de Pesquisa Energética da ANEEL realizado em 2007, apontava a previsão da construção de mais 117 Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs), que deverão ocasionar mais impacto ambiental (CEIVAP, 2009).

Um outro problema está relacionado à extração de areia do Rio Paraíba do Sul que teve início na década de 50 e se intensificou a partir da década de 70, com o aumento da demanda para construção civil, para atender os mercados regionais, principalmente no Estado de São Paulo. Assim, as primeiras cavas as margens do Rio Paraíba do Sul foram

aparecendo e aumentaram de maneira desordenada e sem critérios. Essa atividade mineradora ocorre de forma ostensiva no Vale do Paraíba paulista, trazendo mais poluição à bacia (SUPMED, 2010).

1.1. Características Sanitárias da Região em Estudo

A área de estudo desse trabalho está localizada na cidade de Aparecida, no Estado de São Paulo no Vale do Paraíba, (Figura 1).

Figura 1: Mapa da Bacia do Rio Paraíba do Sul. O retângulo mostra a área de estudo.

Fonte: Comitê de Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (CEIVAP).

O ponto de coleta ($S22.84468^{\circ}$ $O45.23627^{\circ}$) se localiza próximo ao ponto de captação de água para abastecimento público da cidade de Aparecida sendo, o qual se encontra a cerca de 50 metros a jusante do ponto de descarte do efluente do Santuário Nacional.

A cidade de Aparecida possui uma população de 35.007 habitantes. A economia da região baseia-se principalmente no comércio e turismo religioso (IBGE, 2010). Os

serviços de abastecimento de água e esgoto da cidade são prestados pelo Serviço Autônomo de Água e Esgotos e Resíduos Sólidos do município – SAAE, que incluem a coleta, transporte e disposição final dos resíduos sólidos gerados em toda área urbana do município (PLANO INTEGRADO DE SANEAMENTO BÁSICO, 2010).

O SAAE atende a totalidade da área urbana do município, com exceção do bairro dos Fórros. Utiliza o manancial Rio Paraíba do Sul para água de abastecimento. O sistema de captação superficial tem capacidade de 240 L.s^{-1} . A Estação de Tratamento de Água de Aparecida localiza-se junto ao ponto de captação. A capacidade instalada e a demanda é de 140 L.s^{-1} . Portanto, a ETA trabalha no seu limite operacional. Para atender a demanda atual, foram instalados dispositivos para acelerar a etapa de decantação. O sistema de tratamento adotado é o convencional, constituído de câmara de mistura rápida, Floculadores, Decantadores, Filtros e unidades de desinfecção e fluoretação.

O sistema de esgoto sanitário atende 85% do município. A área urbana de Aparecida é cortada pelo Ribeirão da Chácara, Ribeirão dos Moraes e Ribeirão do Sá, todos canalizados, os quais recebem os esgotos brutos coletados e deságuam no Rio Paraíba do Sul em 03 pontos diferentes. Até 2010 o município de Aparecida não possuía sistema de tratamento de esgoto. A partir desta data foi iniciada na cidade a construção de uma estação de tratamento que em 2013 entrou em funcionamento. De acordo com SAAE a mesma tem capacidade de atender 100% da população, porém o funcionamento ainda é precário.

Nessa cidade a captação de água para o abastecimento público está localizado próximo ao ponto de descarte do efluente gerado no Santuário Nacional, além disso o sistema de tratamento de água da cidade do tipo convencional. Sabe-se na grande maioria dos casos esse tipo de tratamento nem sempre é eficiente para a purificação da água. Ainda, a cidade recebe a cada fim de semana milhares de visitantes, aumentando em muito a quantidade em litros de efluente gerado.

Outro problema detectado está relacionado ao esgoto gerado na Basílica que não recebe nenhum tipo de tratamento e deságua no Rio Paraíba juntamente com o esgoto de outros bairros próximos a montante do ponto de captação de água.

Nesse contexto, é muito importante avaliar a ocorrência e o acompanhamento dos Desreguladores Endócrinos (DEs) presentes no Rio Paraíba do Sul, uma vez que os estudos

sobre a ocorrência dessas substâncias na bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul ainda é escassa.

2 Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a ocorrência dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona no trecho médio super do Rio Paraíba do Sul, especificamente na cidade de Aparecida, marcada por intenso turismo religioso.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- Determinar as substâncias bisfenol-A, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona, descritas como desreguladores endócrinos;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica;
- Quantificar as substâncias bisfenol-A, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona, descritas como desreguladores endócrinos;
- Avaliar a influência das variações de pH, precipitação pluviométrica, temperatura, radiação ultravioleta e número de turistas, na concentração dos analitos de estudo.

3 Revisão Bibliográfica

Com o acelerado crescimento populacional e tecnológico do planeta, uma gama de novos produtos foi disponibilizada no mercado, incluindo medicamentos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, plastificantes, solventes químicos, entre outros. Apesar dos benefícios desses compostos, o aumento da produção e consequentemente o seu destino final, tem agravado os problemas ambientais no planeta. Isto, em especial, tem sido provocado pela disposição final dessas substâncias, que muitas vezes são realizadas de forma inadequada.

Nos últimos anos, os ecossistemas aquáticos sofreram grandes alterações em função dos diversos fatores antropogênicos, tais como mineração, construção de represas e barreiras, desmatamento, atividade agrícola intensa e lançamento de efluentes domésticos e industriais em águas superficiais. Assim, devido ao grande crescimento populacional e industrial, o ambiente aquático ficou exposto a diversas substâncias nocivas (BELISÁRIO et al., 2009).

Apesar da emissão de alguns poluentes como pesticidas, compostos policlorados, hidrocarbonetos aromáticos e metais pesados em águas superficiais ter sido reduzida a partir da aprovação de leis que regulamentaram as questões relativas à poluição (AL-ODAINI et al., 2013), a presença de compostos recalcitrantes chamados “contaminantes emergentes”, revelou-se um problema. Até alguns anos atrás, essas substâncias não eram detectadas no ambiente. Estes, em sua grande maioria, são substâncias comuns ao cotidiano e utilizadas em diferentes áreas (VULLIET; CREN-OLIVÉ, 2011). Dentre esses compostos estão incluídos medicamentos, hormônios, produtos de higiene pessoal, alquifenóis, etc. O controle desses poluentes ainda não está incluído em leis regulamentadoras e consequentemente esses compostos têm sido encontrados no ambiente com maior frequência.

Poluentes emergentes podem ser definidos como qualquer substância química sintética ou natural ou qualquer microrganismo que não é vulgarmente monitorado no ambiente, mas tem o potencial para penetrá-lo e causar efeitos adversos ecológicos e/ou efeitos na saúde humana. Estes produtos são produzidos em larga escala em todo o mundo,

são utilizados numa grande variedade de aplicações, e tornaram-se indispensáveis para a nossa sociedade (KUSTER et al., 2008).

O monitoramento desses compostos é relativamente recente, porém os efeitos adversos causados por essas substâncias têm sido objeto de muitos estudos (KUSTER et al., 2010). A toxicidade decorrente da exposição de seres vivos a estes compostos no ambiente ainda não está totalmente clara. Entretanto, estudos atuais mostram que tais substâncias podem interferir no metabolismo e no comportamento dos organismos, causando desequilíbrio das populações atingidas, como as observadas em relação aos efeitos causados por esteróides, os quais podem induzir uma resposta fisiológica tanto em organismos expostos a águas residuais (GRACIA-LOR et al., 2012; MANICKUM; JOHN, 2014; TRENHOLM et al., 2006). Sua presença em água potável utilizadas pela população pode ainda provocar problemas relativos à saúde pública (HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011). É fato que a exposição a estes compostos causam efeitos adversos em certos animais silvestres e peixes. Suspeita-se ainda que causem o aumento da incidência de determinadas doenças humanas relacionadas com o sistema endócrino (DAMSTRA, 2002).

As técnicas robustas de extração e detecção dos poluentes emergentes, decorrentes do progresso da química analítica instrumental, tem permitido a quantificação desses compostos em concentrações cada vez mais baixas, incluindo os desreguladores endócrinos (DEs), uma classe de substâncias muito investigada atualmente (KUSTER et al., 2008).

3.1. Desreguladores Endócrinos (DEs)

O efeito de produtos químicos sobre o sistema endócrino de organismos vivos tem sido muito estudado nos últimos anos devido ao reconhecimento de que o ambiente está contaminado por essas substâncias. Essa perturbação pode ser profunda pelo papel crucial que os hormônios desempenham no controle do desenvolvimento dos seres vivos (GÜLTEKIN; INCE, 2007; HOTCHKISS et al., 2008).

Todas as tentativas de definir os DEs incluem o conceito de desregulação ou interrupção do sistema endócrino, que está relacionada com pequenas alterações bioquímicas ou pequenas alterações a nível celular capazes de gerar danos em longo prazo (FERREIRA, 2013).

Os DEs são substâncias exógenas, que podem afetar negativamente o funcionamento do sistema endócrino causando alterações no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos seres vivos, (AL-ANSARI et al., 2010) alterando a homeostase dos organismos, o equilíbrio hormonal e os padrões normais de regulação gênica durante o desenvolvimento e diferenciação celular. Fazem parte de um grupo extremamente diverso de compostos, ou mistura deles, tais como pesticidas e herbicidas, substâncias produzidas por plantas, fungos e cianobactérias, fármacos, metais pesados, ftalatos, alquilfenóis, hormônios naturais e sintéticos, poluentes orgânicos persistentes, etc., que interferem com as vias endócrinas e podem induzir a desregulação gênica em organismos expostos. Desta forma, é difícil determinar quais produtos químicos deve ou não ser classificadas como desreguladores endócrinos (CORREIA; FONTOURA, 2015; DEL-MAZO et al., 2013; HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2014; KIM et al., 2007; PINTO; ESTÊVÃO; POWER, 2014)

Segundo a União Europeia (2001 apud¹ BILA; DEZOTTI, 2007, p.651), os Desreguladores Endócrinos podem danificar diretamente um órgão endócrino, alterar diretamente sua função, interagir com um receptor de hormônios ou alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino.

Alguns pesquisadores definem esses compostos com base em seus efeitos, ou seja, são substâncias que mesmo em concentrações muito baixas são capazes de interagir com o sistema endócrino causando algum tipo de efeito como, por exemplo, câncer, ações prejudiciais ao sistema reprodutivo e outros efeitos adversos (GHISSELLI; JARDIM, 2007; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Tais substâncias são mundialmente conhecidas como “Endocrine Disruptors” (EDs) ou ainda “Endocrine Disrupting Chemicals” (EDCs). A tradução para língua Portuguesa tem gerado algumas definições diferentes como “Perturbadores Endócrinos”, “Disruptores Endócrinos”, “Desreguladores Endócrinos”, “Interferentes Endócrinos”, “Estrogênios

¹ European Workshop on Endocrine Disrupters, European ED workshop, Aronsborg (Balsa) Sweden, 2001.

Ambientais” entre outros (GHISSELLI; JARDIM, 2007). Neste trabalho será utilizado o termo “Desreguladores Endócrinos” (DEs).

A agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – USEPA (United States Environmental Protection Agency) define Desreguladores Endócrinos (DEs) como agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação da constância interna), reprodução, desenvolvimento e comportamento (CAMPBELL et al., 2006).

Estudos relatam a presença destes compostos em estações de tratamento de esgoto (ETEs) e em águas superficiais e subterrâneas, causada pela remoção parcial dessas substâncias nos processos de tratamento de água (FERREIRA, 2013).

Atualmente existe uma gama de compostos identificados como sendo DEs. No entanto, como mais produtos químicos são testados a cada ano, o número de respostas estrogênicas também aumenta, de forma que, a lista de DEs está longe de ser completa e tem aumentado continuamente como o desenvolvimento tecnológico. Até o momento, centenas de compostos considerados desreguladores endócrinos e milhares de outros, suspeitos de ter propriedades semelhantes foram identificados (DEL-MAZO et al., 2013; FERREIRA, 2013; KIM et al., 2007).

Os DEs são divididos em três classes: estrogênios esteróides naturais e sintéticos (estrogênios), substâncias sintéticas usadas em produtos industrializados (xenoestrogênios) e substâncias originadas de plantas (fitoestrogênios).

Os estrogênios são reguladores chave das mudanças fisiológicas associadas com a reprodução em ambos os sexos e também regulam muitos outros processos fisiológicos importantes, incluindo a função imunológica e a homeostase mineral (HAMID; ESKICIOGLU, 2012; PINTO; ESTÊVÃO; POWER, 2014). Entre os estrogênios naturais encontram-se o β -estradiol, Estrona e Estriol e entre os sintéticos, o 17α -etinilestradiol.

Os fitoestrogênios são compostos vegetais presentes em altas concentrações em soja, trevo, alfafa e outros legumes. Podem induzir efeitos estrogênicos, por possuírem semelhanças estruturais com os estrogênios, ou, em alguns casos, antiestrogênicos e tem sido aplicados na medicina como agente de reposição hormonal (KUSTER et al., 2009).

Os xenoestrogênios são substâncias químicas sintéticas que mimetizam a ação dos estrogênios, ou seja, agem como estrogênios no organismo. Alquilfenóis polietoxilados (APEs) são amplamente utilizados em aplicações domésticas e comerciais, sendo utilizados como emulsionantes em produtos de limpeza. Durante o tratamento de águas residuais urbanas e industriais, esses compostos são sucessivamente degradados para substâncias menos biodegradáveis. Por exemplo, o nonilfenol (NP) e octilfenol (OP) (FERREIRA, 2013), os quais podem interagir com receptores de estrogênios no organismo.

Entre os xenoestrogênios, os três principais grupos mais estudados são os bisfenóis, alquilfenóis e ftalatos. São produzidos em grandes quantidades, sendo que uma fração substancial é liberada para o meio ambiente (GÜLTEKIN; INCE, 2007).

A produção de bisfenol-A (BFA) supera cinco milhões de toneladas por ano. É usado essencialmente como um monômero para a produção de plásticos, incluindo embalagens de alimentos, garrafas de água e mamadeiras (DHAINI; NASSIF, 2014; RUBIN, 2011). Também é usado na produção de resinas epóxi e de poliéster de estireno insaturado, retardadores de chama, fungicidas, antioxidantes e produtos químicos derivados da borracha. Além disso, é empregado em resina para obturações dentárias, revestimentos de latas, tintas em pó e como aditivo em papel térmico. É liberado para o ambiente aquático através das descargas industriais, chorume e cursos d'água contendo detritos plásticos (GÜLTEKIN; INCE, 2007; ROCHESTER, 2013).

A atividade estrogênica do BFA está relacionada com a interrupção da ação do hormônio da tireoide, alteração do desenvolvimento das glândulas mamárias, células germinativas e pode causar anomalias cromossômicas. A USEPA estabeleceu a dose aceitável de ingestão diária para o BFA de $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corporal.dia⁻¹ (BROWNE et al., 2013).

Em países industrializados, a presença de BFA foi confirmada em mais de 95% das amostras de urina analisadas. Este composto tem a característica de conseguir contaminar o ambiente em grande escala, pois possui a facilidade de se separar das estruturas em que se encontra quando há alterações de temperatura ou após a lavagem com substâncias ácidas ou alcalinas (CORREIA; FONTOURA, 2015).

Outro grande grupo que pode ser caracterizado como DEs são os metais pesados, tais como cádmio, chumbo e mercúrio, que apesar de não interferir com a atividade hormonal, sob altas concentrações são tóxicas para as células gonadais de peixe (FERREIRA, 20013).

Na Tabela 1 encontra-se listado alguns exemplos de DEs.

Os estrógenos naturais β -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e o sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) o qual foi desenvolvido para uso médico em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos, causam forte impacto ambiental, tanto pela potência como pela quantidade contínua introduzida nos corpos d'água. Estes hormônios possuem a melhor conformação (Figura 2) reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos desreguladores nos organismos. Podem causar alterações em organismos aquáticos mesmo em concentrações extremamente baixas (GORGA; PETROVIC; BARCELÓ, 2013).

Os estrogênios compartilham a mesma rede tetracíclica que consiste em um anel fenólico (A), dois ciclohexanos (B e C) e um anel de ciclopentano (D). ConFigurações diferentes do anel D nas posições C16 e C17 formam compostos diferentes. As propriedades físico-químicas dos estrógenos desempenham um papel importante para prever seu destino no ambiente ou em estações de tratamento de esgoto e água. O coeficiente de partição octanol / água (K_{ow}), definido como a concentração de um composto em *n*-octanol e água em condições de equilíbrio a uma temperatura específica, são utilizados para prever a sorção de um composto na fase orgânica. Sendo assim os estrogênios são considerados como moderadamente hidrofóbicos, possuindo uma tendência de se sorver com a fase sólida (CHANG et al., 2009; HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

A estrona (E1), o β -estradiol (E2) e o estriol (E3) são hormônios derivados do colesterol que ocorrem em humanos. A E1 é o hormônio predominante em mulheres na menopausa, o E2 é o principal hormônio feminino e é importante para regulação do ciclo menstrual, já o E3 é um estrogênio sintetizado em grandes quantidades na durante a gravidez. É formado a partir do E2 através da adição de um grupo etinil na posição C17 resultando em um composto que é muito mais resistente à biodegradação em comparação a seu precursor (HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

Tabela 1: Exemplos de compostos Desreguladores Endócrinos.

Classe de Compostos Estrogênicos	Substância
Estrogênios hormônios feminos naturais	Estrona-3-glucoronídeo
	17 β -estradiol
	Estradiol-17-glucoronídeo
	Estriol
	Estriol-3-sulfato
	Estriol-16-glucoronídeo
	Estrona
Estrogênios hormônios femininos sintéticos	Progesterona
	Dietilestilbestrol
	Progesterona
	Valerato de estradiol
	17 β -etinilestradiol
	Noretindrona
Fitoestrogênios	Levonorgestrel
	Daidzeína
	Biochanina
	Coumestrol
	Resveratrol
	Genisteína
	β -sitoesterol
	Enterolactona
Xenoestrogênios	Enterodiol
	Dieldrin
	4-terc-octilfenol
	4-nonilfenol
	Alquilfenóis polietoxilados
	Bifenilas policloradas
	Bisfenol-A
	Bisfenol-A conjugado com glucoronídeo
	Bisfenol-A conjugado com sulfato
	Bentazona
	Mecoprop
	Permetrina
	Carbofurano
	Atrazina
	Terbutilazina
	Desetilterbutilazina
	Kepone
	Toxafeno

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2: Estrutura de Lewis dos principais hormônios estrogênicos.

Fonte: Reis filho; Araújo e Vieira, (2006).

A concentração de DEs em superfícies aquáticas é bastante variada estando presentes em uma ampla faixa que vai de $\mu\text{g.L}^{-1}$ até ng.L^{-1} . Em águas superficiais, os estrógenos E1, E2, E3 e EE2, detectados na faixa de ng.L^{-1} , já são capazes de provocar efeitos adversos em organismos expostos (CLOUZOT et al., 2008; GÜLTEKIN; INCE, 2007).

Rivas-Rivera et al. (2014) investigaram alterações fisiológicas e endócrinas em Carpas (*Cyprinus carpio*) expostas a sedimentos. Coletaram amostras em quatro pontos ao longo do baixo Rio Uruguai. Os ensaios foram realizados em um período de 30 dias com sessenta peixes. O estudo mostrou aumento na produção de vitelogenina plasmática (VTG), que é uma proteína produzida sob ação de estrógenos no organismo, demonstrando que além de águas superficiais, os sedimentos, também são responsáveis pela biodisponibilidade de DEs no ambiente.

Dussault et al. (2009) demonstraram a ocorrência de bioacumulação do 17α-etinilestradiol em *chironomus tentans* e *hyalella azteca*, ambos invertebrados bentônicos. Os ensaios foram realizados em água e sedimento. A bioacumulação detectada em *C. tentans* foi significativamente maior do que *H. azteca*. Essa diferença pode ser explicada

pela ciclo de vida de cada um desses organismos. Como esses organismos representam uma fonte de alimento a certos peixes, o EE2 bioacumulado é consequentemente transferido para os peixes através da cadeia trófica, agravando ainda mais o impacto ambiental desses estrogênios.

3.2. Vias de Contaminação por Desreguladores Endócrinos

Os DEs são encontrados e monitorados no ambiente de todo planeta. Como já dito, os DEs estão presentes em águas superficiais, esgoto tratado, solo e até mesmo em água potável, podendo afetar tanto a qualidade da saúde de seres humanos como de outros seres vivos.

Os DEs são descartados através da agricultura, da indústria, dos seres humanos, de produtos de uso doméstico e de vários produtos farmacêuticos. Esses compostos atingem o meio ambiente a partir de diferentes fontes. A principal ocorre através do lançamento, em corpos hídricos, de efluentes industriais e esgotos domésticos, tratados ou *in natura*. Os hormônios EE2, E2 e E1 chegam ao ambiente principalmente através da excreção de fezes e urina de seres humanos e animais. Além disso, bisfenol-A (BFA), nonilfenóis (NP) e ftalatos tem sido detectados constantemente em esgoto bruto ou tratado e derivam da decomposição de produtos industrializados.

Os rios, lagos e aquíferos que recebem esses poluentes estão frequentemente próximos a grandes centros populacionais e, por conseguinte, podem afetar a qualidade da água potável produzida (MANICKUM; JOHN, 2014; MOREIRA et al., 2011; ROCHA; CRUZEIRO; ROCHA, 2013).

Para agravamento do problema, as ETEs convencionais não são projetadas para a remoção de micropoluentes, como os DEs, que são apenas parcialmente removidos. Isto decorre tanto pelo déficit de infraestrutura em saneamento, como pela ineficiência das estações de tratamento (KUSTER et al., 2010).

Mesmo possuindo um tempo de meia-vida relativamente curto, quando comparados a outros compostos orgânicos, os estrogênios naturais são continuamente introduzidos no

ambiente, o que lhes confere caráter de persistência. Assim, tanto o efluente gerado como o lodo formado nos tratamentos se tornam fontes de contaminação (GÜLTEKIN; INCE, 2007; HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011; JOHNSON; SUMPTER, 2001; KUSTER et al., 2009; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Os estrogênios naturais, E1, E2 e E3 quando excretados na urina encontram-se conjugados, basicamente na forma de sulfatos e glucoronídeos, os quais ocupam a posição C3 e / ou C17 dessas moléculas. Estes conjugados polares são biologicamente inativos e mais solúveis em água em comparação com o seu homólogo não conjugado correspondente (GORGA; PETROVIC; BARCELÓ, 2013).

No entanto, esteróides no estado livre são constantemente detectados tanto em afluente como efluentes de estações de tratamento, o que sugere que a desconjugação ocorra em algum lugar entre excreção e a descarga do efluente da ETE, tornando-os passíveis de desencadear efeitos deletérios. Na verdade, a desconjugação é fruto da ação de bactérias como a *Escherichia coli* presente nas fezes que sintetizam e liberam grandes quantidades de β -glucuronidase e arilsulfatase. Essas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações glucoronídeas e sulfato, respectivamente. A natureza mais recalcitrante de conjugados sulfatados nos tratamentos de águas residuais, pode ser explicada pela menor atividade da enzima arilsulfatase, comparada com β -glucuronidase (AL-ANSARI et al., 2010; HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

No caso dos fitoestrogênios, a liberação ocorre diretamente a partir de plantas cultivadas. No entanto, esses fitoesteróides são menos potentes (em até duas ordens de magnitude) do que o composto de referência β -estradiol. As concentrações de fitoestrogênios encontrados em águas superficiais, são na sua maioria inferiores a 10 ng.L^{-1} (KUSTER et al., 2009). No entanto, Kawanishi et al. (2004) encontraram concentrações extremamente elevadas em águas de rio no Japão. Daidzeína e genisteína foram encontrados em concentrações de 43 e $143 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Além do esgoto sanitário, essas substâncias podem atingir o solo e a água através dos efluentes industriais, escoamento de campos agrícolas e lixiviação de aterros sanitários (Figura 3), que são importantes fontes de contaminação por xenoestrogênios (BENOTTI et al., 2009; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010).

Os resíduos excretados pelo gado, suínos e outros animais também são fontes potenciais de estrogênios esteróides. Contêm quantidades apreciáveis de estrona, estradiol e estriol (KHANAL et al., 2006). Assim, a lixiviação de áreas agrícolas adubadas com esterco tem um impacto significativo no meio ambiente, resultando num elevado nível de estrogênios em corpos receptores adjacentes.

As indústrias de papel e celulose ou ainda indústrias de bioetanol e biodiesel, também contribuem significativamente para a presença de fitoestrógenos em corpos d'água superficiais, através de seus efluentes (HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

As fontes de contaminação ambiental podem ser pontuais - os efluentes de águas residuais estações de tratamento, os efluentes de indústrias, agricultura atividades, lixiviados, etc; ou difusas – infiltrações no solo dos compostos utilizados na agricultura e indústria, até atingir as águas subterrâneas, a recarga de aquíferos com água contaminada, fossas sépticas, disseminação de lamas provenientes do tratamento de águas residuais, etc. (Figura 3) (FERREIRA, 2013; HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

Os meios de exposição aos DEs não se resumem apenas ao contato com águas contaminadas. Podem ocorrer de diferentes formas: alimentos contaminados como carnes de bois que foram tratados com anabolizantes, pesticidas em frutas e verduras, formulações a base de soja, leite materno, cosméticos, etc.

Através da dieta os seres humanos estão constantemente expostos aos DEs, quer pela ingestão de água contaminada, ou por alimentos armazenados em recipientes plásticos, ou por resíduos de detergente utilizados na lavagem de utensílios domésticos, como é o caso da contaminação por bisfenol-A (BFA)(PLOTAN et al., 2013). Um exemplo de exposição seria a ingestão de leite de vaca contaminado produzido nas condições atuais da pecuária intensiva. Como os animais são ordenhados durante a segunda metade da gravidez, o consumo do leite implicaria na ingestão de quantidades apreciáveis de progesterona (ALVES et al., 2007; BILA; DEZOTTI, 2007; MANTOVANI; FUCIC, 2014). Outro exemplo desse tipo de contaminação seria o relatado em um estudo realizado no Líbano. Nesse país, a maioria da população depende de água engarrafada para beber e cozinhar. Dhaini; Nassif (2014) quantificaram os níveis de BFA em amostras de água coletadas a partir de garrafas de PC comercialmente disponíveis no mercado libanês. Nesse estudo, foram simuladas as condições de armazenagem e transporte. Todas as garrafas de água

foram mantidos fechadas e expostas à luz solar durante 72 h numa zona ao ar livre, a uma temperatura máxima de 35 °C, durante o mês de setembro, antes dos testes laboratoriais. Os resultados mostraram que cinquenta e nove por cento das amostras apresentaram níveis de BFA acima dos limites de detecção ($> 0,05 \text{ ng.mL}^{-1}$). As concentrações variaram de 50 a 1.370 ng.L^{-1} de BFA.

Figura 3: Diferentes rotas de exposição dos Desreguladores Endócrino

Fonte: Aquino; Brandit; Chernicharo (2013).

3.3. Ação dos Desreguladores Endócrinos

A função primária de um sistema endócrino é transformar vários estímulos exógenos em mensageiros químicos e hormonais, resultando na expressão apropriada de genes e síntese de proteínas e / ou ativação de sistemas enzimáticos específicos do tecido já existente. Os três principais tipos de hormônios que regulam o sistema endócrino são os estrógenos, andrógenos, e os hormônios da tireoide (GÜLTEKIN; INCE, 2007).

3.3.1. Sistema Endócrino

O sistema endócrino (Figura 4) é constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo, como hipófise na base do cérebro, a tireoide, as

gônadas e as glândulas suprarrenais, e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios e progestagênios, a testosterona e a adrenalina (BERGMAN et al., 2013).

Figura 4: Conjunto de glândulas que compõem o sistema endócrino.

Fonte: Ghisselli; Jardim (2007).

Os hormônios são substâncias produzidas pelas glândulas e excretadas para a corrente sanguínea onde serão carregadas até o local de ação, controlando as funções do organismo como um todo (GHISSELLI; JARDIM, 2007).

De modo geral, os hormônios se ligam a receptores específicos para exercer um tipo de ação e de acordo com suas similaridades estruturais são agrupados em cinco classes principais: derivados de aminoácidos, neuropeptídicos, proteicos, derivados de vitamina e os esteróides. Os hormônios proteicos, peptídeos e derivados de aminoácidos interagem com receptores de membrana. Esteróides, hormônios tireoidianos, vitamina D e retinóides são lipossolúveis e interagem com receptores nucleares intracelulares (FONTENELE et al., 2010).

A hipófise é a principal glândula do sistema endócrino e influencia a produção e liberação de outros hormônios. Hormônios reprodutivos, esteróides (estrógenos, andrógenos, progesterona) controlam os processos fisiológicos associados com a

reprodução. Os hormônios tireoidianos controlam os processos metabólicos e coordenam estes e os hormônios envolvidos no apetite, regulação do peso corporal e do metabolismo. Os hormônios adrenais controlam as várias respostas fisiológicas ao stress (BERGMANN et al., 2013).

O sistema endócrino representa uma importante ferramenta para a coordenação do desenvolvimento e metabolismo dos seres vivos. Estímulos exógenos como a duração do dia, a temperatura, a luz, bem como estímulos endógenos geralmente conhecidos como o relógio "interno", são processados no sistema nervoso central. Depois de uma complexa cadeia de processos bioquímicos, o hipotálamo segrega a liberação de hormônios ou libera hormônios de inibição que controlam a secreção de hormônios da glândula pituitária. Estas glicoproteínas excretadas induzem a síntese e liberação de hormônios de tecidos específicos nas diversas glândulas (timo, tireoide, paratireoides, suprarrenais, pâncreas, pineal, testículos e ovários). Hormônios excretados por estas glândulas internas viajam através da corrente sanguínea para os tecidos alvos onde se ligam a um receptor. Esta mudança é transmitida através da membrana plasmática de uma célula em diferentes formas, dependendo do tipo de hormônio (LINTELMANN et al., 2003).

Apesar de muitas etapas, este sistema sensível pode ser influenciado por diferentes estímulos externos. A maioria dos efeitos dos DEs é atribuída à função das gônadas, que controlam o desenvolvimento de diferenciação sexual, características sexuais secundárias, e o funcionamento dos órgãos sexuais (LINTELMANN et al., 2003)

O colesterol é o precursor das cinco principais classes de hormônios esteróides. De acordo com o seu número de átomos de carbono as classes são divididas, segundo Lintelmann et al. (2003) em:

C21: derivados de pregnano, assim chamados progestágenos, glicocorticóides, e mineralocorticóides;

C19: derivados de androstano, chamados androgênios; e

C18: derivados de estrona, os chamados estrogênios.

Estrógenos e progestágenos são hormônios femininos com diferentes ações. Os estrogênios (estradiol, estrona, estriol) são responsáveis pelas características sexuais secundárias femininas e regulação de reprodução. Estradiol estimula a proliferação e

crescimento nos órgãos do trato reprodutivo, ativa o desenvolvimento do endométrio do útero, e influencia na libido. Os estrogênios ajudam a manter a gravidez e a preparar os seios para a lactação. A progesterona ajuda a regular as mudanças que ocorrem durante menstruação e influencia o desenvolvimento das membranas fetais e glândulas mamárias durante a gravidez (LINTELMANN et al., 2003).

Os principais andrógenos ou hormônios masculinos são a testosterona e diidrotestosterona. Eles promovem o desenvolvimento e diferenciação de órgãos de reprodução masculino, antes e após o nascimento. Andrógenos determinam características sexuais secundárias masculinas (LINTELMANN et al., 2003).

Os hormônios são importantes para os vertebrados e invertebrados. Eles são essenciais para o controle de um grande número de processos no organismo, tais como, o início de diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário e a formação de órgãos, para o controle de tecido e a função dos órgãos em idade adulta (BERGMANN et al., 2013).

3.3.2. Mecanismos de Ação

Muitos hormônios apresentam seu efeito no tecido alvo por influenciar a transcrição de genes específicos que levam a um aumento da biossíntese ou inibição de proteínas específicas. Assim, os hormônios interagem com receptores produzindo um aumento da produção de RNAm seguido por um aumento da expressão da proteína, resultando finalmente em efeitos observados, tais como aumento crescimento nos órgãos do aparelho reprodutor e as glândulas mamárias (LINTELMANN et al., 2003).

Hormônios esteróides exercem sua ação na célula alvo através de receptores intracelulares ou de membrana. O mecanismo genômico empregando receptores intracelulares consiste de regulação – estimulação ou inibição – da expressão de genes particulares. As etapas iniciadas pela ligação do hormônio com os receptores intracelulares é seguida pela translocação do complexo esteróide-receptor para o núcleo, a sua ligação a elementos de esteróides regulados e a transativação torna acessíveis os sítios de iniciação para a transferase de RNAm e a iniciação da transcrição, o que inclui uma série de interações proteína-proteína com fatores nucleares (muitas vezes chamados de co-

ativadores ou co-receptores) muitos dos quais apenas recentemente foram descobertos. Os DEs podem interferir com todas estas etapas, levando a uma incrível diversidade e complexidade da ação de substâncias (HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2014).

O mecanismo pelo qual um produto químico interrompe a ação do hormônio tem um impacto muito grande no padrão de efeitos que se espera observar. Geralmente, existem dois caminhos pelos quais um produto químico pode atrapalhar a ação de um hormônio: a ação direta sobre um complexo de proteínas de receptores hormonais, ou uma ação direta sobre uma proteína específica que controla a excreção de um hormônio. Assim, um produto químico pode bloquear a síntese de um hormônio (BERGMANN et al., 2013).

O mecanismo de ação dos DEs é ainda em grande parte desconhecido. As ações dos DEs podem ser mediadas pela ligação direta por sistemas enzimáticos em receptores nucleares ou de membrana, esteróides e não esteróides, incluindo neurotransmissores. A ligação a estes receptores resulta na estimulação ou inibição dos mecanismos de transcrição ou pós-transcrição celular, interferindo com a atividade dos canais de iões ou de proteínas que atuam como segundo mensageiros (CORREIA; FONTOURA, 2015).

Os DEs interferem de alguma forma com a ação hormonal, e ao fazê-lo podem produzir efeitos adversos na saúde humana e animal. Os sistemas fisiológicos afetados por esta perturbação provavelmente incluem todos os sistemas hormonais que vão desde o desenvolvimento e função dos órgãos reprodutivos até diabetes em adultos ou doença cardiovascular (BERGMANN et al., 2013).

Os receptores nucleares (RNs) estão envolvidos em praticamente todas as funções vitais, por exemplo, o desenvolvimento fetal, a homeostase, reprodução, metabolismo e resposta a substâncias xenobióticas. Os receptores hormonais desta família são os receptores de hormônio esteroide (RE), receptores de hormônios andrógeno (RA), receptor de progesterona (RP), receptor de glicocorticoides (RG) e receptor de mineralocorticoides, bem como os receptores de hormônios da tireoide (TRs) (SWEDENBORG et al., 2009).

DEs podem possuir vários mecanismos de ação, no entanto, pelo fato de que muitos DEs são pequenos compostos lipofílicos, uma via privilegiada é através de sua interação direta com um dado RN, que presumivelmente perturba ou modula a expressão do gene. Por exemplo, a maioria DEs associados a defeitos reprodutivos e de desenvolvimento interferem com a função do receptor de estrógeno (RE) e/ou receptor de andrógeno (RA),

assim podem interromper a atividade normal de estrógenos e andrógenos endógenos (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011).

Os receptores hormonais possuem uma grande afinidade por seus respectivos hormônios e quando a concentração deste no organismo é baixa, isso gera um efeito produzindo uma resposta natural (Figura 5). Isso explica porque substâncias exógenas mesmo presente em baixas concentrações são capazes de gerar um efeito causador de uma resposta (GHISSELLI; JARDIM, 2007).

Figura 5: Disfunções Endócrinas.

Fonte: Gisselle; Jardim (2007).

Alguns DEs podem ligar-se diretamente a estes receptores quer como agonistas ou antagonistas, aumentando ou inibindo o efeito de um hormônio, respectivamente.

Um agonista exógeno pode ser definido como uma substância que pode ligar a um receptor como o substrato natural e “ativá-lo”. A ativação do receptor de hormonal conduz aos mesmos efeitos que pode ser causada pela ação do hormônio endógeno. A potência de um agonista exógeno depende da sua afinidade ao receptor bem como da sua capacidade para ligar ao receptor (LINTELMANN et al., 2003).

Outras substâncias podem agir sobre os receptores hormonais através de um mecanismo antagônicos: um antagonista é uma substância que bloqueia ou diminui respostas induzidas por agonistas no receptor. A inibição do receptor pode ser do tipo competitivo (isto é, o agonista endógeno e exógeno antagonista competem pelo mesmo sítio de ligação) ou pode ser não competitivo (isto é, os inibidores se ligam ao receptor inativando-o, mas em um local diferente do sítio de ligação da substância endógena) (LINTELMANN et al., 2003).

Em resumo, os DEs podem agir no organismo de três formas diferentes: imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo organismo desencadeando assim, um feito semelhante ao hormônio natural; bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios, impedindo a ação dos hormônios naturais, ou afetando a biossíntese, o metabolismo e transporte. Podem agir a nível do genoma, influenciando a expressão de genes e até mesmo através de mecanismos epigenéticos, incluindo efeitos sobre o imprinting genômico (GHISSELLI; JARDIM, 2007; HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2014; PLOTAN et al., 2013).

No organismo o bisfenol-A pode atuar como um antiestrogênico, ou seja, bloquear a resposta estrogênica por competir com E2 endógeno e pode também ligar-se diretamente aos receptores de andrógenos, e é possivelmente considerado um antiandrogênico, bloqueando a ação dos androgênios endógenos (ROCHESTER, 2013).

Um estudo realizado por Kjeldsen e Bonefeld-Jørgensen (2013) demonstrou, através de um estudo *in vitro*, o potencial de compostos perfluorados para atuar como agonista em RE e antagonistas em RA. Além disso, houve um efeito negativo na regulação da atividade enzimática da aromatase, enzima pertence ao grupo de enzimas do citocromo P450 que agem como mediadoras da aromatização de andrógenos em estrógeno, ou seja, converte hormônios andrógenos em estrógenos.

Particular atenção foi dedicada à atividade da aromatase, não só em humanos e roedores, mas também em peixes em relação ao forte impacto dos DEs em água na reprodução dos mesmos. Em roedores, foi mostrado que o bisfenol-A de plastificantes podem aumentar a atividade da aromatase na próstata de ratos. Ao mesmo tempo, o bisfenol-A afetou a expressão de outra importante enzima – 5 α -redutase - existente sob a forma de três isoenzimas (5 α -R1, 5 α -R2 e 5 α -R3) – que metaboliza esteróides. Embora a expressão das duas primeiras isoenzimas é inibida por bisfenol-A, a terceira, 5 α -R3, conhecida como um biomarcador para a malignidade, é aumentada. Isto é um exemplo do efeito sinérgico de desreguladores em vários locais, cada um conduzindo a um aumento do risco de câncer. Outro alvo para DEs são isoenzimas responsáveis pela sulfatação de estrógenos, andrógenos e seus precursores na via biossintética. A sulfatação desempenha um papel importante na desintoxicação e no controle da atividade de esteróides. Sulfotransferases foram inibidas por ftalatos, fenóis clorados e também por alguns fitoestrogênios (HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2014).

Como visto, os DEs podem atuar em vários níveis diferentes, e as ações mais bem estudadas são aquelas em que os compostos se ligam aos REs e as ações estrogênicas copiam ou bloqueiam as normais. No entanto, outras ações perturbadoras, menos estudadas incluem alterações no receptor ou disponibilidade hormonal (que afetam a sua síntese, o transporte, metabolismo e excreção) e outros mecanismos mais recentemente identificados de ação incluem a perturbação causada pela ligação a outros receptores (PINTO; ESTÊVÃO; POWER, 2014).

3.4. Ecotoxicidade dos Desreguladores Endócrinos

Os efeitos adversos de DES sobre o sistema reprodutivo em seres humanos e animais silvestres tornaram-se uma grande questão para a ciência. A correlação entre a exposição e a saúde, incluindo eventuais impactos de longo prazo ainda é discutida, sendo uma tese muito complicada e controversa, que é difícil de confirmar.

A origem da hipótese da ação dessas substâncias no sistema endócrino de organismos expostos se deu pela observação de características femininas em machos de aves coloniais expostos a agrotóxicos na região dos Grandes Lagos (EUA – Canadá). O mesmo fenômeno foi relatado em populações de Jacaré de lagos da Flórida na década de 80. Em seres humanos essa observação se deu pelo aumento nos casos de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram Dietilestilbestrol (DES), um estrógeno sintético usado para prevenir o aborto, entre os anos de 1940 e 1970. Essa substância causou alterações no desenvolvimento das filhas incluindo adenocarcinoma de células da vagina, e anormalidades estruturais do colo do útero, no útero, e da trompa. (ALVES et al., 2007; BERGMAN et al., 2013; BILA; DEZOTTI, 2007; HOTCHKISS et al., 2008; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Outros exemplos de efeitos não intencionais de DEs em humanos estão relacionados à utilização de xampus contendo estrógenos, os quais podem causar a antecipação da puberdade nas meninas e ginecomastia em meninos. Em alguns dos xampus, por exemplo, foram detectados até 4 mg de estradiol por 100 g de produto. Além disso, estudos clínicos documentaram a impotência sexual de trabalhadores de fábricas expostos ao ácido dissulfônico, um derivado do estilbeno. Estes estudos foram realizados

em resposta a queixas de impotência e diminuição da libido entre homens trabalhadores envolvidos na manufatura do ácido dissulfônico (KUNZ et al., 2004).

Embora a maioria dos efeitos em seres humanos tenham sido ocasionados devido a exposições ocupacionais ou farmacêuticas, centenas, se não milhares de publicações mostram associações entre as exposições aos DEs e seus efeitos adversos em seres humanos (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011; KUNZ et al., 2004; MANTOVANI; FUCIC, 2014). Além disso, estudos com animais de laboratório, fortalecem a ocorrência de muitos desses efeitos adversos observados no ambiente e ainda proporcionaram a elucidação dos mecanismos para explicá-los (HOTCHKISS et al., 2008).

Grande parte do interesse sobre a exposição aos DEs na saúde humana vem dos efeitos adversos causados na função e no desenvolvimento reprodutivo de ambos os sexos, incluindo a qualidade e diminuição de sêmen (isto é, números reduzidos, mortalidade, e alterada morfologia dos espermatozoides), anormalidades do trato reprodutivo masculino (por exemplo, hipospádia e criptorquidia), infertilidade, aumento da incidência de ovários policísticos, alterações na glândula da tireoide, endometriose, puberdade precoce e menarca precoce, anormalidade fetal, obesidade, diabetes e câncer de mama, útero e testículos como uma consequência do aumento da exposição a compostos estrogênicos endógenos e exógenos (ALVES et al., 2007; CORREIA; FONTOURA, 2015; DAMSTRA, 2002; HAMID; ESKICIOGLU, 2012; MELO; BRITO, 2014; PLOTAN et al., 2013).

Dados mostraram um declínio na densidade de espermatozoides masculinos nos Estados Unidos e Europa. Verificou-se também que havia uma correlação entre a contagem de esperma mais baixo e altas concentrações de bifenilos policlorados (PCB) em estudos com soro de sangue realizados nos Países Baixos. Muitos tecidos humanos mostram expressões de receptores de estrogênios, incluindo o cérebro, sistema imunitário, sistema cardiovascular, pulmões, glândulas mamárias, fígado, rins, sistema reprodutor (ovário, testículos, útero, próstata), tecido adiposo e ossos (CHANG et al., 2009).

O equilíbrio estrogênio / andrógeno é um componente chave no ajuste de todo o processo da puberdade, interagindo com fatores de crescimento e a maturação de todos os órgãos e sistemas. Contudo, a exposição aos DEs pode alterar esse equilíbrio e o desenvolvimento puberal (MANTOVANI; FUCIC, 2014).

Na verdade, as mudanças no sistema endócrino ocorrem sistematicamente por fatores naturais ambientais, e frequentemente compostos liberados no ambiente podem não causar qualquer tipo de distúrbio. A questão é, até que ponto cada indivíduo exposto pode se adaptar sem gerar qualquer tipo de patologia a diferentes concentrações dos desreguladores endócrinos? As consequências da exposição podem ser exibidas, não só em nível individual, mas também no nível de sua prole, ou seja, pode haver mudanças e efeitos no nível da população (FERREIRA, 2013).

A maioria dos estudos sobre DEs tem focado predominantemente a interação dessas substâncias com os sistemas hormonais estrogênicos, androgênicos e o sistema hormonal da tireoide. No entanto, um número crescente de estudos apontam para a interação desses compostos com os outros sistemas controlados pelos hormônios (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011). Assim, devido o impacto dos DEs sobre as atividades hormonais, atualmente os estudos sobre os efeitos potenciais têm se concentrado tanto no sistema reprodutor como também sobre outros sistemas fisiológicos, como o sistema imunitário, cardiovascular e neuronal. Especificamente, tem sido demonstrado que alguns compostos organofosforados com atividade hormonal podem estar envolvidos no aumento da incidência de certas desordens metabólicas, tais como obesidade e diabetes tipo II (ESTEBAN et al., 2014; HOTCHKISS et al., 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário a exposição aos DEs podem causar maiores danos, cujos efeitos podem manifestar-se tardiamente. É o que está implícito no conceito de “base fetal da doença adulta” como foi sugerido por Barker em 1997, propondo que as fases de desenvolvimento fetal e neonatal são um período crítico de elevada susceptibilidade a fenômenos de desregulação, que podem levar a mecanismos fisiopatológicos adaptativos que condicionam o desenvolvimento futuro (CORREIA; FONTOURA, 2015).

É nessa fase que os DEs sozinhos, ou em misturas, provocam fortes efeitos, muitas vezes irreversíveis, nos órgãos em desenvolvimento, ao passo que a exposição de adultos provoca menor ou nenhum efeito. Consequentemente, há agora uma crescente probabilidade de que a exposição fetal e infantil a poluentes químicos desempenhem um papel maior na etiologia de várias doenças e distúrbios endócrinos da tireoide, dos sistemas imunológicos, digestivos, cardiovasculares, reprodutivos e metabólicos, incluindo a

obesidade infantil e a diabetes, do que se pensava possível (BERGMAN et al., 2013; ESTEBAN et al., 2014).

Animais expostos a baixas doses de bisfenol-A durante o período perinatal mostraram malformações e alterações do sistema reprodutivo, das glândulas mamárias, e do cérebro (RICHTER et al., 2007). Os animais também demonstraram um comportamento anormal, redução da fertilidade, e obesidade (VANDENBERG et al., 2009). A atual dose diária tolerável (TDI), criado pela Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) para BFA é de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$, idêntica à dose de referência (RFD) definido pela Agência de Proteção Ambiental (EPA). No entanto, estudos relatam que o BPA poderia ser um desregulador endócrino em doses várias vezes menor do que as RFD e TDI (DHAINI; NASSIF, 2014).

Akin et al. (2015) investigaram a possível ligação entre bisfenol-A e a síndrome do ovário policístico (SOP). Um total de 112 meninas com SOP e 61 controles entre 13 e 19 anos de idade foram incluídas no estudo. Os resultados mostraram que as adolescentes com SOP tinham concentrações significativamente maiores de níveis séricos de bisfenol-A que as controles, independentemente da obesidade. Concentrações de bisfenol-A foram significativamente correlacionados com os níveis de andrógenos, levando a inferir que essa substância pode desempenhar um papel na etiopatogenia da SOP em adolescentes.

Além disso, os DEs estão ligados a uma variedade de efeitos adversos na saúde de animais selvagens e domésticos, como cânceres hormônios-dependentes, doenças do sistema reprodutivo e redução reprodutiva (GÜLTEKIN; INCE, 2007).

Organismos aquáticos são alvos particularmente importantes, pois estão expostos, ao longo de toda sua vida, a compostos presentes em efluentes domésticos e industriais.

Entre muitas espécies de peixes, o processo de feminilização, como malformação dos testículos ou peixes hermafroditas, foi observado a jusante de efluentes de esgotos municipais. Portanto, agentes químicos estrogênicos liberados por efluentes municipais lançados no meio aquático podem causar respostas biológicas anormais em espécies expostas (AL-ANSARI et al., 2010; CLOUZOT et al., 2008).

A fisiologia de peixes é frequentemente semelhante ao dos humanos, em particular no nível molecular. Adicionalmente, o sistema reprodutivo desses organismos é regulado

por hormônios similares aos dos mamíferos. Então é de se esperar que a exposição dos peixes aos DEs gere algum tipo de efeito (FICK et al., 2010; REIS FILHO et al., 2007), como por exemplo, o aumento das taxas de feminilização (REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007).

A determinação de produtos farmacêuticos no plasma sanguíneo de peixes pode ser usado para avaliar o risco de efeitos farmacológicos, pois as concentrações podem ser comparadas com as encontradas nos níveis plasmáticos terapêuticos em seres humanos. Fick et al. (2010) expuseram trutas arco-íris a efluentes não diluídos de esgoto tratado em três locais da Suécia durante 14 dias. A concentração de 25 produtos farmacêuticos foi determinada no plasma sanguíneo e nos efluentes por LC-MS e CG-MS. O progestágeno levonorgestrel, esteroide sintético com atividade de progesterona, foi detectado no plasma sanguíneo de peixes em concentrações que variaram $8,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ – $12 \mu\text{g.L}^{-1}$, valores que excedem o nível plasmático terapêutico humano ($2,4 \mu\text{g.L}^{-1}$). Essas concentrações são extremamente altas para peixes e pode ser comparada as concentrações plasmáticas em mulheres que utilizam pílula contraceptiva de emergência.

Os principais efeitos causados por estrógenos em peixes incluem desenvolvimento sexual alterado, presença de espécies intersexuais, mudança no comportamento de acasalamento, etc. A alta incidência de intersexualidade foi descrita em peixes das espécies *Rutilus rutilus* e *Sander vitreus vitreus*, em rios que receberam efluentes de ETEs domésticos e municipais contendo hormônios estrogênicos (JOBLING et al., 1998; POLLOCK; DUBE; SCHRYER, 2010; PURDOM et al., 1994). Foi observado ainda alterações no comportamento de acasalamento em *Danio rerio* exposto a EE2 na concentração de $9,86 \text{ ng.L}^{-1}$ com diminuição do cortejamento da fêmea, levando a reprodução reduzida (COE et al., 2010).

Al-Ansari et al. (2010), reportaram a diminuição na fecundidade no vairão (*Pimephales promelas*) quando em contato com o 17α -etinilestradiol em concentrações de $0,3\text{-}5 \text{ ng L}^{-1}$. Também foi observada a feminilização nesse peixe e em peixe-zebra (*Danio rerio*) expostos a concentrações ainda mais baixas ($0,05\text{-}5 \text{ ng.L}^{-1}$).

A inibição da ovulação de várias espécies de peixes e alteração do desenvolvimento das caudas dos girinos em espécies de rãs (*Xenopus laevis*) e anomalias no desenvolvimento dos otólitos de peixe-zebra durante a embriogênese precose, foram

observadas quando essas espécies foram postas em contato com o BFA (ESTEBAN et al., 2014).

A atividade estrogênica de uma substância pode ser medida através da determinação dos níveis de vitelogenina (VTG) no plasma sanguíneo de um organismo (Figura 6). A VTG é uma proteína que desempenha um papel importante no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas. É sintetizada no fígado, regulada por estrogênio e transportada através do sangue para os ovários, onde serão incorporados no desenvolvimento dos óvulos (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Figura 6: Representação esquemática simplificada da sequência de processos que leva à síntese do biomarcador de exposição VTG em peixes machos.

Fonte: Reis Filho; Araújo; Vieira, (2006).

De um modo geral, o gene do VTG também está presente em organismos machos, mas sob condições normais não é expresso, possivelmente, pela baixa concentração de estrogênio no sangue. O aumento de VTG no plasma de um organismo é considerado uma evidência da exposição a substâncias com atividade estrogênica (BILA; DEZOTTI, 2003). Sua presença em peixes machos só é possível mediante indução externa, já que sua síntese é desencadeada pela atividade de hormônios femininos (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Kidd et al. (2007) realizaram um experimento radical. Contaminaram um lago de água doce localizado em uma área experimental no Canadá com 17α -etinilestradiol. O

resultado mostrou a feminilização de peixes machos (Fathead), determinada pela produção de vitelogenina (VTG), o que quase levou a espécie a extinção no local do experimento.

Al-Ansari et al. (2010) investigaram a bioacumulação de EE2 em peixes Shorthead Redhorse suckers (ShRHS) (*Moxostoma macrolepidotum*) presentes no Rio St. Clair no Canadá, contaminado com altas concentrações de contaminantes de efluentes industriais e municipais. Os resultados mostraram que oito em cada dez machos capturados em um ponto amostral possuíam concentrações detectáveis de VTG e EE2 o qual foi encontrado em 50% das amostras.

Brian et al. (2005) relataram a indução de VTG em peixes expostos ao EE2 cujo o EC_{50} foi tão baixo quanto 1 ng L^{-1} .

Estudos laboratoriais demonstraram que as concentrações de E2, E1 e EE2 encontrada em alguns ambientes aquáticos que receberam efluentes domésticos são suficientes para induzir a feminilização de peixes engaiolados. As concentrações reportadas para indução de VTG em truta arco-íris, exposta por 21 dias foram de 9 ng L^{-1} , 44 ng L^{-1} , e $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ de E2, E1, e EE2, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados para a espécie de peixe ciprinídeo (THORPE et al., 2003). Estes autores reportaram ainda, que a exposição de ovos fertilizados do peixe zebra (*Danio rerio*) a uma solução contendo 100 ng.L^{-1} de E2, induziu a feminilização do canal de reprodução após um período de 21 a 42 dias contados a partir da fertilização, que abrange o período de diferenciação sexual

Thorpe et al. (2003) mantiveram ainda por 14 dias trutas arco-íris fêmeas juvenis sob exposição dos estrógenos E1, E2 e EE2. Os resultados mostraram claramente que o EE2 foi consideravelmente mais potente na indução VTG em peixes. Esse forte efeito do EE2, combinado com a sua persistência no meio ambiente, em comparação, com os esteróides naturais, e a sua capacidade de bioacumulação, mostram quão impactante este hormônio pode ser. O trabalho mostrou ainda que os hormônios E2 e EE2 agem conjuntamente causando efeito sinérgico.

Peixes expostos a $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de nonilfenol e octilfenol mostraram redução significativa do crescimento testicular. Machos expostos a 2 ng L^{-1} de EE2 sofreram algum tipo de perturbação. A síntese de VTG por peixes machos ou juvenis também foi avaliada. Peixes da espécie *Pimephales promelas* foram expostos por três semanas ao EE2, E1 e E2,

ao nonilfenol e bisfenol-A. Os alquilfenóis induziram a produção de VTG em peixes machos sendo que o efeito observado para o BFA ocorreu a partir de concentrações superiores de $160 \mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, concentrações de EE2 de apenas 1 ng L^{-1} foi suficiente para a síntese de VTG que foi a mais potente (CLOUZOT et al., 2008), o que corrobora os resultados obtidos por Thorpe et al. (2003).

Por sua natureza lipofílica e persistente, esses hormônios se bioacumulam ou se biomagnificam em peixes, afetando toda a cadeia do ciclo alimentar, o que por fim atinge o homem pondo em risco sua saúde (PINTO; ESTÊVÃO; POWER, 2014).

A exposição de ratos a DEs foi citada por Del-Mazo et al. (2013). Em um protocolo definido, as mães foram expostas a esses compostos duas semanas antes do acasalamento. Ao mesmo tipo de exposição e dosagem foram mantidas durante a gravidez e após quatro semanas a contar do nascimento dos filhotes. Os resultados mostraram que os diferentes DEs atuaram por diferentes mecanismos e vias moleculares, determinados pelos padrões de expressão gênica, no desenvolvimento dos testículos e da diferenciação das células germinativas das crias.

Alguns fitoestrogênios foram detectados em concentrações suficientes para provocar alterações reprodutivas em animais domésticos. A "Doença do Trevo", que é caracterizada por distocia, prolapso uterino e até infertilidade permanente, foi observada em ovelhas que normalmente pastam o trevo contendo potentes estrógenos vegetais (HOTCHKISS et al., 2008).

Ração animal contaminada com o Zearalenona, uma micotoxina com efeitos estrogênicos produzida pelo fungo *Fusarium spp.* pode induzir efeitos adversos em uma larga variedade de animais domésticos, incluindo a fertilidade prejudicada em vacas e hiperestrogenismo em suínos e perus (HOTCHKISS et al., 2008).

Damstra (2002) reportou o adelgaçamento da casca de ovo e alterações no desenvolvimento gonadal em aves de rapina expostas ao DDT (diclorodifenildicloroetano), provocando grande declínio da população dessas aves. Relatou ainda, alteração na função endócrina reprodutiva em peixes presentes nas proximidades das descargas de efluentes de papelaria e esgotos domésticos, contribuindo para a alteração no seu desenvolvimento reprodutivo. Efeitos nocivos mediados pelo sistema endócrino também foram observados em gastrópodes marinhos expostos ao tributilestanho (TBT). A masculinização dessas aves

proporcionou um forte declínio da população exposta. O mecanismo endócrino aceito se relaciona aos níveis elevados de andrógenos, possivelmente, através da atividade alterada da enzima aromatase que os converte em estrógenos. Efeitos semelhantes também foram confirmados por Fernandez et al. (2002), na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, e ao longo da costa de Fortaleza, no Ceará, onde se observou a ocorrência do chamado imposex nos gastrópodes. Essa alteração parece estar relacionada a fontes pontuais de compostos organoestânicos, usados como antiincrustantes em embarcações e estabilizadores em plásticos e pesticidas.

Os estudos toxicológicos têm focado a exposição de organismos a compostos individuais. No entanto, a exposição a misturas de substâncias no ambiente é a regra, não a exceção. A evidência a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* geralmente indica que as misturas de DEs exibem efeitos aditivos, sinérgicos ou mesmo antagônicos (HOTCHKISS et al., 2008).

Efeito de hormônios estrogênicos no crescimento de plantas tem sido estudado, porém, em menor quantidade que em animais. Plantas que foram tratadas com hormônios sexuais ou seus precursores tiveram influência na divisão celular, crescimento da raiz e da parte aérea, no crescimento do embrião, floração e tubo polínico (JANECZKO; SKOCZOWSKI, 2005).

3.5. Tecnologias Utilizadas para Degradação e Remoção de Desreguladores Endócrinos em Estações de Tratamento de Água e Esgoto

A dificuldade de remoção de substâncias químicas, como os micropoluentes emergentes, entre eles os DEs em ETEs e ETAs, representa uma barreira importante no controle e disseminação desses compostos no ambiente aquático.

As técnicas de tratamento convencionais, tais como processos de coagulação, floculação e precipitação, não estão em conformidade com o nível de remoção desejado, especialmente para os compostos de baixa massa molar (100 a 500 g.mol⁻¹). A eficiência da remoção de cada DE varia dependendo dos tipos de operações unitárias e processos

habitualmente utilizados nas ETEs. Segundo Chang et al. (2009), o processo de remoção adequado para um composto alvo tem de ser cuidadosamente selecionados, levando-se em conta suas características, sua concentração e suas diferentes propriedades físicas e químicas (Tabela 2).

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos Desreguladores Endócrinos de interesse Bisfenol-A, β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e Estrona.

Desregulador Endócrino	Estrutura molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Pressão de Vapor (Pa)	Log K _{ow}	pKa
Bisfenol-A		228,29	300	5,32.10 ⁻⁶	3,4	-
β -estradiol		272,3	13	3.10 ⁻⁸	3,94	10,4
17 α -etinilestradiol		296,4	4,8	6.10 ⁻⁹	4,15	10,46
Estrona		270,4	13	3.10 ⁻⁸	3,43	10,4

Fonte: Clouzot et al. (2008); Ec (2010); Hamid; Eskicioglu, (2012); Reis Filho; Araújo; Vieira (2006).

Compostos polares tendem a permanecer na fase aquosa, o que favorece sua entrada no ambiente aquático. Por outro lado, compostos pouco polares, são mais adsorção no lodo (MELO et al., 2009).

Sistemas biológicos compostos por lagoa de areação, sedimentação e lodo estão entre os mais utilizados nos sistema de tratamento de efluentes nas ETEs no Brasil (REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007).

Esses tipos de tratamento trabalham com microrganismos confinados em um sistema para degradação da matéria orgânica. Sendo assim, a degradação que ocorreria

dentro do corpo receptor é realizada dentro desses sistemas criados especificamente para esse fim. Os microrganismos presentes nos sistemas biológicos degradam a matéria orgânica e o efluente pode então teoricamente ser lançado no corpo receptor (FERREIRA; CORAIOLA, 2008).

3.5.1. Lodo Ativado

O tratamento por lodo ativado é um dos mais utilizados e difundidos sistemas de tratamento de esgoto, por se tratar de um sistema com baixo custo de implantação, grande eficiência na remoção de matéria orgânica e também por produzirem efluentes que atendam padrões de qualidade atualmente exigidos, exceto no que diz respeito aos micropoluentes (CLOUZOT et al., 2008; FERREIRA; CORAIOLA, 2008; JELIC et al., 2011).

Esse tipo de sistema possui um tanque de aeração, onde uma alta concentração de flocos microbianos é mantida em suspensão promovendo a degradação da matéria orgânica (Figura 7). Após o tanque de aeração se encontra o tanque decantador, onde ocorre a sedimentação dos flocos microbianos, formando assim o lodo de fundo. O sobrenadante clarificado pode ser então descartado no corpo receptor ou seguir para tratamento complementar. O lodo que se sedimentou no decantador é recirculado para o tanque de aeração, permitindo que o sistema opere com elevada concentração microbiana aumentando assim a eficácia do processo (SANT'ANNA, 2010).

Figura 7: Esquema simplificado do tratamento biológico de lodo ativado.

Uma característica importante desse processo é o tempo de retenção do lodo. Quanto maior o tempo de retenção maior é a eficiência da biodegradação dos poluentes. Por exemplo, quando o tempo de retenção ficar acima de 20 dias, a biodiversidade microbiana se torna maior com capacidades fisiológicas mais amplas do que os lodos com tempo de retenção abaixo de 20 dias. Entretanto frequentemente esse tipo de sistema opera com tempos de retenção abaixo de 20 dias (CLOUZOT et al., 2008).

Um ponto crítico do sistema é a sedimentabilidade do lodo. Se a mesma não for adequada, a concentração de microrganismos no tanque de aeração será menor que o necessário diminuindo, assim, sua eficácia (SANT'ANNA, 2010).

O 17 α -etinilestradiol (EE2) pode ser adsorvido em partículas no tratamento de lodo ativado. Por exemplo, nesse processo, a quantidade adsorvida de EE2 pode chegar a faixa de 60% a 80%, sendo que o restante permanece na fase aquosa. Entretanto, para estrogênios naturais, a taxa de remoção pelo processo de lodos ativados é geralmente maior que 75 %, entretanto para 17 α -etinilestradiol (EE2) é frequentemente inferior a 80% (CLOUZOT et al., 2008).

Outro fator importante é quanto ao descarte do lodo, pois este também se transforma em uma fonte de disseminação de resíduos de DEs no ambiente.

Contudo, a presença de DEs em efluentes tratados em ETEs confirma a baixa eficiência dos sistemas biológicos, para a remoção desse tipo de composto. Uma alternativa seria aumentar o tempo de retenção de sólidos nos processos biológicos, de forma a aumentar a taxa de degradação. Outra alternativa seria a aplicação de novas tecnologias de tratamento.

Algumas técnicas disponíveis para a efetiva remoção dos DEs em efluentes podem ser citadas e incluem o uso de biorreatores com membrana (BRMs), processos oxidativos avançados (POAs) e adsorção em carvão ativado (CA).

3.5.2. Biorreatores de Membrana (BRMs)

A separação por membrana, empregando osmose reversa (OR) e membranas de nanofiltração (NF), é relatada como sendo eficaz na remoção de microcontaminantes, tais como DEs e produtos farmacêuticos e cuidados pessoais (PPCPs). As propriedades da membrana, tais como a hidrofobicidade de superfície e de cargas, desempenham um papel significativo na retenção de tais compostos, porque estão presentes em níveis extremamente baixos, com grupos funcionais diferentes (CHANG et al., 2009).

A remoção dos microcontaminantes por meio de processos de membrana de baixa pressão, tais como microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), é limitada, devido ao maior tamanho dos poros, mas pode tornar-se mais seletivo através da combinação com outros tratamentos (CHANG et al., 2009), como por exemplo a combinação de um sistema biológico com um processo físico de filtração (Figura 8).

Figura 8: Variantes do sistema de biorreatores de membrana.

Fonte: (PROCESSOS DE TRATAMENTO DE EFLUENTE).

A tecnologia BRM integra degradação biológica da matéria orgânica presente nas águas residuais com filtração por membrana, superando assim, as limitações dos tratamentos convencionais (PETROVIC et al., 2009).

A introdução de membranas ao sistema de lodo ativado pode aumentar significativamente a eficácia do processo.

O processo de membrana permite o uso de maiores concentrações de biomassa no biorreator e maior tempo de retenção, resultando em lodos com maior capacidade de adsorção e melhor degradabilidade dos compostos. Tratamento de águas residuais com esse tipo de tecnologia levou a redução para cerca de 99% dos hormônios. A alta taxa de

remoção dos hormônios pode ser explicada pelo menor tamanho dos flocos, resultando em uma maior superfície de contato (CLOUZOT et al., 2008).

Além disso, as membranas possuem tamanhos de poros que podem variar entre 0,035 μm e 0,4 μm , o que caracteriza o processo como nanofiltração e microfiltração, respectivamente. A classificação do processo de filtração é mostrada abaixo e na Figura 9 (TOMAZ, 2010):

Figura 9: Classificação dos diferentes processos de filtração dos biorreatores de membrana.

Fonte: Adaptado (TOMAZ, 2010).

- Microfiltração (MF): a membrana tem poros que variam de 0,1 μm a 1 μm de diâmetro. Pode remover partículas como bactérias, cistos e oocistos.

- Ultrafiltração (UF): variam de 0,01 a 0,1 μm e pode remover partículas e moléculas grandes, incluso bactérias e vírus.

- Nanofiltração (NF): neste caso as membranas são similares ao Osmose Reversa (OR) e a taxa de rejeição é baixa. Entre 0,001 μm a 0,01 μm .

- Osmose Reversa (OR): neste caso as membranas podem rejeitar até pequenos solutos iônicos tais como sais como os que estão livres na água mineral.

Vários estudos confirmaram a vantagem da utilização de BRM em relação ao sistema convencional do tipo lodo ativado. Para várias substâncias farmacêuticas,

observou-se que as concentrações foram significativamente mais baixas nos efluentes finais do que em um tratamento convencional (PETROVIC et al., 2009).

Em outro estudo realizado por KIM et al. (2007), sobre o processo de BRM com fármacos e hormônios (estriol, testosterona, androstenediona), constatou-se a remoção de aproximadamente 99% dos contaminantes. Os processos de osmose reversa e nanofiltração mostraram excelentes taxas de remoção para todos os analitos detectáveis. No entanto, a combinação de membranas com irradiação UV não se mostrou vantajoso. Além disso, verificou-se que OR não apresentou porcentagens maiores de remoção quando comparado com NF, o que é importante em termos de custo para ETAs e ETEs. Nesse sentido a tecnologia BRM tem se mostrado como um processo alternativo vantajoso para as ETEs na remoção de micropoluentes (CLOUZOT et. al., 2008). Entretanto, sua utilização em larga escala implica em custos elevados.

3.5.3. Processos Oxidativos Avançados

Os POAs tem sido cada vez mais empregados na remoção e mineralização da maioria dos poluentes orgânicos (FENG et al., 2013).

São processos que envolvem a produção *in situ* de espécies altamente reativas, como o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), o qual é a espécie de oxidante mais poderoso, com potencial de oxidação de 2.80V (Tabela 3). Ao contrário de outros radicais, o $\text{OH}^\cdot$ não é seletivo e, portanto, reage facilmente com um grande grupo de produtos químicos orgânicos, convertendo-os em produtos menos complexos e intermediários menos tóxicos (GÜLTEKIN; INCE, 2007).

Os radicais podem reagir com contaminantes orgânicos por diferentes mecanismos, dependendo da estrutura do composto-alvo (MELO et al., 2009).

A eficiência na remoção é geralmente proporcional à potência de oxidação, e esta é em função da estrutura do contaminante, do oxidante e da dose. Particularmente, a estrutura química dos compostos alvos afeta a taxa de oxidação de DEs. Os compostos, que

forem desprovidos de porções aromáticas, apresentaram menor eficiência de remoção oxidativa por ozonização (CHANG et al., 2009).

A eficiência na formação de radicais hidroxilas pode ser aumentada pela utilização de radiação UV ou visível ou pela adição de um catalisador.

Tabela 3: Potencial de oxidação para várias substâncias oxidantes.

Agente Oxidante	Potencial de Oxidação (eV)
Flúor	3,0
Radical Hidroxila (OH [•])	2,8
Ozônio	2,1
Peróxido de Hidrogênio	1,8
Permanganato de Potássio	1,7
Dióxido de Cloro	1,5
Cloro	1,4

Fonte: Tambosi (2008).

Existem várias metodologias via processos oxidativos avançados:

- **Processo H₂O₂/UV:**

O processo que combina peróxido de hidrogênio com radiação UV é um dos POAs mais antigos e foi usado com êxito em tratamento de efluentes. O uso desses dois sistemas combinados é muito mais eficiente que a utilização de cada um separadamente pela maior formação de radicais hidroxila (BRITO; SILVA, 2012). A principal reação envolvida é mostrada abaixo (Equação 1):

A degradabilidade do BFA por lâmpadas UV de baixa e média pressão foi de 5% e 10-25% por fotólise direta, respectivamente. No entanto, a exposição da mesma amostras ao processo UV/H₂O₂ com uma taxa de fluência de 1000 mJ cm⁻² (típica da taxa de irradiação em estações de tratamento de água) resultou em mais de 90% de degradação do Bisfenol-A. Houve também uma redução de quase 100% na atividade estrogênica, por aplicação UV/H₂O₂ (GÜLTEKIN; INCE, 2007).

- **Processo TiO₂/UV:**

Reações Fotocatalíticas via fótons gerados por TiO_2 foram exaustivamente estudadas na remediação de águas durante as últimas duas décadas. Sob irradiação UV o TiO_2 é fotoativado para formar espécies ativas de oxigênio (por exemplo, radicais $\text{OH}^\bullet$). Os radicais reagem prontamente com uma ampla gama de compostos orgânicos produzindo CO_2 . A vantagem aparente do presente método é o seu excelente potencial de mineralização dos compostos (GÜLTEKIN; NINCE, 2007).

- **Ozonização:**

Oxidação química utilizando ozônio tem provado ser um processo de tratamento bastante eficaz para um vasto espectro de micropoluentes orgânicos durante a avaliação comparativa, piloto e experiências em grande escala, tanto em águas residuais como em água potável (BROSÉUS et al., 2009). O ozônio pode atuar na oxidação de contaminantes por mecanismo direto ou indireto. No primeiro, a molécula de ozônio reage diretamente por ataque eletrofílico a átomos com uma densidade de carga negativa ou a insaturações. O mecanismo indireto envolve a produção de radicais hidroxilas em meio alcalino. Pode-se ainda aplicar a combinação $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, o que acelera a produção de radicais hidroxilas (Equação 2) (GÜLTEKIN; INCE, 2007; HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011; MELO et al., 2009).

Devido ao seu elevado potencial de oxidação, o tratamento com ozônio é amplamente utilizado no tratamento da água potável para a desinfecção, remoção de cor, sabor, odor e controle, redução de subprodutos da desinfecção formação, aumento biodegradabilidade e também para a degradação de sucesso de muitos contaminantes orgânicos (BROSÉUS et al., 2009).

Broséus et al., (2009) estudaram a remoção de compostos orgânicos, dentre eles desreguladores endócrinos, durante a ozonização aplicada no tratamento de água potável utilizando duas matrizes, água ultra pura e água natural, todas enriquecidas com os compostos de interesse. No geral, a ozonização removia mais de 80% dos compostos orgânicos com valor de CT ($\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$) de $2 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$. No entanto os pesticidas foram os compostos mais recalcitrantes com remoção menor que 65% para a cinarizina com CT de $13,5 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$.

Foi demonstrado que ozonização pode efetivamente remover compostos com anéis fenólicos, tais como a estrona, o estradiol e etinilestradiol (WU et al., 2012).

A verificação da atividade estrogênica do EE2 depois que a solução foi exposta ao ozônio, mostrou que os intermediários formados tiveram atividade estrogênica 200 vezes menor do que a inicial. Entretanto, o custo elevado do processo explica porque ele é usado, em alguns países, somente para tratamento de água potável. Economicamente, os tratamentos de águas residuais usados para proteger o ecossistema aquático devem ser mais baratos do que os tratamentos utilizados para produzir água potável. Esta observação explica em parte, porque o processo de lodo ativado é geralmente usado para o tratamento de águas residuais (CLOUZOT et al., 2008).

- **Processo fenton e foto-fenton:**

No processo fenton os radicais hidroxila são produzidos a partir do H_2O_2 na presença dos íons Fe(II) em meio ácido (Equação 3) (BRITO; SILVA, 2012).

O processo fenton é indicado por muitos pesquisadores por sua eficácia na remoção de vários poluentes orgânicos perigosos em efluentes.

O processo que combina irradiação ultravioleta com fenton é chamado foto-fenton e pode ser mais eficiente na degradação dos compostos, pois, a irradiação de UV pode promover a redução do Fe(III) a Fe(II) promovendo assim a regeneração do Fe(II) para reação com H_2O_2 , além de produzir radicais hidroxilas adicionais (Equação 4) (MELO et al., 2009).

Um dos problemas encontrados nos tratamentos por POAs é a geração de novos compostos, por vezes, mais tóxicos de que os de origem. Um exemplo é a degradação do bisfenol-A por POAs, pois, em alguns casos, o subproduto pode ainda exercer atividade endócrina e/ou pode ser mais tóxico. Devido a este fato, as pesquisas relacionadas à degradação por POAs, devem ser acopladas com a análise dos subprodutos formados. Em geral, as análises de atividade estrogênica de efluentes tratados por técnicas de POAs,

exibiram reduzida ou nenhuma atividade hormonal em relação a amostra original (GÜLTEKIN; INCE, 2007).

3.5.4. Adsorção em Carvão Ativado

O carvão ativado (CA) é um adsorvente microporoso que pode ser obtido a partir de uma variedade de materiais carbonáceos. Seu poder adsorvente é proveniente da alta área superficial e da presença de uma variedade de grupos funcionais em sua superfície (SILVA GUILARDUCI et al., 2006).

A sorção de compostos orgânicos em CA é controlada basicamente por interações físicas e químicas, em que tanto os microporos quanto as propriedades ácido-base da superfície tem papel essencial no mecanismo do processo (SILVA GUILARDUCI et al., 2006).

A adsorção, utilizando carvão ativado granular (GAC), geralmente remove a maioria dos contaminantes orgânicos, incluindo os DEs. No entanto, para assegurar a estabilidade do processo, parâmetros de adsorção e fatores operacionais exigem um controle rigoroso, tal como constantes cinéticas e de equilíbrio, tempo de contacto, a solubilidade, tipo de carbono, a competição com a matéria orgânica natural, etc. Grande atenção tem sido focada na adsorção seletiva de DEs individuais usando vários adsorventes. A modificação desses adsorventes também é outro importante fator a ser investigado para a remoção de desreguladores endócrinos. Vários tipos de superfície modificada de sílica mesoporosa foram sintetizadas e comparadas com carvão ativado para a eficiência de remoção seletiva do BFA. Embora a quantidade de remoção do BFA foi menor do que a do carbono ativado, a superfície de sílica modificada mesoporosa promoveu uma melhor eficiência de reciclagem (CHANG et al., 2009).

Adsorção em carvão ativado granular (CAG, um tipo de carvão ativado) é usado muitas vezes por causa da alta capacidade de sorção de compostos como os DEs e adsorveu completamente EE2 em concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, o CAG tem uma meia vida muito curta, o que o torna dispendioso (CLOUZOT et al., 2008).

3.6. Análise do Desreguladores Endócrinos

O desenvolvimento de métodos analíticos, incluindo HPLC, CG/MS, CG-MS/MS, e de LC-MS/MS impulsionaram os estudos envolvendo a determinação dos micropoluentes. Estas técnicas analíticas são extremamente sensíveis e precisas para o monitoramento de compostos presentes em baixas concentrações, entre eles os DEs (BILA; DEZOTTI, 2007; CAMPBELL et al., 2006; TRENHOLM et al., 2006).

Espectrometria de massa em tandem acoplado em cromatografia líquida (LC-MS/MS) é uma tecnologia analítica poderosa para nível de rastreio contaminante identificações de detecção e de degradação de contaminantes emergentes (WU et al., 2012).

Atualmente, técnicas eletroquímicas vêm sendo desenvolvidas para monitoração de compostos emergentes na água. Essas técnicas tem a vantagem de serem técnicas mais rápidas, fáceis, muitas vezes mais baratas, possuindo alta eficácia e confiança (BROWNE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; PENU et al., 2015).

Além da análise química por cromatografia, pode ser realizado bioensaios como complemento para a determinação de DEs no ambiente. Para a avaliação da atividade estrogênica pode-se utilizar diferentes organismos como peixes para a verificação da produção de vitelogenina presente no plasma como já citado ou radioimunoensaios com frações do fígado, cultivo de células para o teste de proliferação de células do câncer de mama denominadas MCF-7 ou o uso de leveduras geneticamente modificadas.

3.6.1. Técnicas Cromatográficas

A cromatografia é um método físico e químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente

retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS, 2006).

Se a fase móvel for um gás, a técnica é chamada de cromatografia em fase gasosa e se for líquida, cromatografia em fase líquida.

Existem vários tipos de cromatografia em fase líquida e de acordo com Mendham et al. (2002), elas podem ser divididas em:

- Cromatografia líquido-sólido: baseia-se em interações dos solutos em sítios ativos de um adsorvente sólido finamente dividido, usado como fase estacionária;
- Exclusão por volume (ou tamanho): a separação ocorre de acordo com o volume da molécula em solução e do tamanho dos poros da resina (ou gel) utilizada;
- Troca iônica: baseia-se na separação de cátions e ânions por meio da utilização de resinas trocadoras de íons;
- Cromatografia líquido-líquido: baseia-se na distribuição de moléculas do soluto entre duas fases imiscíveis, de acordo com as solubilidades relativas. O meio de separação é um sólido inerte finamente dividido que suporta uma fase líquida fixa (fase estacionária). A separação é feita passando-se uma fase móvel sobre uma fase estacionária normalmente empacotada em uma coluna. Nos casos em que a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar, denomina-se cromatografia líquido-líquido em fase normal. Para os casos em que a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, denomina-se cromatografia em fase reversa.

Os materiais de suporte para a fase estacionária podem ser esferas de vidro por exemplo, e o mesmo não deve interagir com o analito. Para evitar alguns dos problemas associados com a cromatografia líquido-líquido, como a perda da fase estacionária, pode-se ligar quimicamente a fase estacionária ao material de suporte sendo denominada cromatografia com fase ligada (MENDHAM et al., 2002).

Esse tipo de fase estacionária pode se obtido a partir de diversas reações químicas a partir da sílica ou outros suportes. A reação mais utilizada é a formação da ligação siloxano (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Em colunas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a fase ligada mais importante é do tipo apolar C-18, onde o grupo R é substituído por octadecila (Figura 10).

Figura 10: Cadeia orgânica do tipo C-18 imobilizada na superfície de sílica.

Fonte: Silva et al. (2004).

Existem, no entanto, vários tipos de colunas e detectores. Os detectores de absorvância no UV visível se baseiam na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética, em um dado comprimento de onda. Esse tipo de detector é seletivo, pois detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda em que opera o detector (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Contudo, diante da complexidade de amostras ambientais, a mesma não pode ser analisada diretamente em um sistema cromatográfico. Sendo necessária sua extração da amostra ambiental, por meio de uma pré-concentração e eluição, sendo assim posteriormente analisada por cromatografia.

3.6.2. Extração Fase Sólida

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica largamente utilizada para preparação de amostras a fim de se isolar os analitos de interesse. O método de SPE utiliza uma fase sólida como um adsorvente seletivo para separar um analito particular por meio de adsorção, em amostras líquidas, fluidas ou gasosas. O analito isolado no adsorvente de fase sólida é “purificado” pela passagem de uma solução de lavagem com a finalidade de

remover constituintes indesejados retidos com o analito alvo, que em seguida é eventualmente dessorvido da fase sólida por meio de eluição com o solvente orgânico específico, ou por dessorção térmica para a fase gasosa (CHANG et al., 2009; POOLE, 2003).

A EFS vem substituindo a clássica extração líquido-líquido (ELL) e tornou a técnica mais comum na preparação de amostra em áreas como meio ambiente, análises biológicas e de alimentos. Na EFS, os analitos a ser extraídos são divididos entre uma fase sólida e uma fase líquida, e estes analitos devem ter maior afinidade com a fase sólida do que com a matriz de amostra. A escolha do adsorvente é, portanto, um ponto-chave na EFS. Esta escolha depende fortemente dos analitos de interesse e as interações entre o adsorvente escolhido através dos grupos funcionais dos analitos. No entanto, isso também depende o tipo de matriz da amostra e suas interações tanto com o adsorvente e o analitos (FONTANALS; MARCÉ; BORRULL, 2005).

A EFS de amostras líquidas se tornou uma técnica amplamente utilizada no início dos anos 1980. Com a introdução de cartuchos descartáveis, contendo adsorventes quimicamente ligados, e um tamanho adequado para o processamento de amostras por sucção suave. Dispositivos típicos de cartucho consistem em colunas curtas (geralmente um tambor de seringa aberta) contendo um sorvente com um tamanho de partícula nominal de 50 - 60 μm , embalado entre plástico poroso ou metal (Figura 11) (POOLE, 2003).

A EFS emprega sorventes recheados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos aqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Em geral, os procedimentos de EFS contêm 4 etapas: 1) condicionamento do cartucho pela passagem de solvente adequado; 2) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; 4) eluição e coleta do analito (Figura 12) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Um dos parâmetros mais importantes na aplicação de um método de SPE é a seleção de um adsorvente sólido apropriado para o analito alvo, bem como o uso de solventes para a lavagem e eluição (CHANG, 2009).

Figura 11: Etapas de extração em fase sólida: A) Condicionamento do cartucho; B) Passagem da amostra; C) Lavagem dos cartucho para retirada dos interferentes e D) Eluição dos analitos.

Fonte: Queiroz; Collins; Jardim, (2001).

Os materiais utilizados na EFS podem variar bastante (Figura 12) dependendo do solvente de condicionamento e de eluição. Os grupos mais frequentemente usados como sorventes são à base de sílica quimicamente ligados e podem ser divididos em três categorias: 1) fase reversa (FR) quando o sorvente é menos polar que o solvente de eluição; 2) fase normal (FN) quando o solvente é menos polar que o sorvente e 3) troca iônica (TI) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Para aumentar a seletividade na EFS houve o desenvolvimento de outros tipos de fases, como por exemplo colunas recheadas com suporte contendo anticorpos os Imunoadsorventes (ISS), polímeros de impressão molecular (MIP) e de acesso a material restrito (RAMs) (FONTANALS; MARCÉ; BORRULL, 2005).

Existe também outras configurações experimentais para a realização da EFS como por exemplo a extração em discos, técnicas de extração “on-line” e microextração em fase sólida (MEFS).

Discos de EFS foram desenvolvidos inicialmente para fornecer taxas de processamento de amostras maiores para grandes volumes de amostra e para minimizar entupimento por partículas em suspensão e componentes da matriz. Desde diâmetro pequeno os discos são facilmente preparados, e também são preferidos para o tratamento de um volume pequeno de amostras (POOLE, 2003).

Figura 12: Exemplo de diferentes sorventes que são utilizados para extração em fase sólida.

NÃO POLARES		
C18	Octadecilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$
C8	Octilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$
C2	Etilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$
C1	Metilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_3$
PH	Fenilsilano	$\equiv \text{Si} - $
CH	Cicloexilsilano	$\equiv \text{Si} - $
POLARES		
FL	Florisil	MgO_3Si
AL	Alumina	Al_2O_3
Si	Sílica	$\equiv \text{Si} - \text{OH}$
CN	Cianopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CN}$
2OH	Diolsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2 - $
NH2	Aminopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$
PSA	N-Propiletlenodiaminossilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$
TROCA IÔNICA		
SCX	Benzenossulfonilpropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - $ $- \text{SO}_3\text{H}^+$
PRS	Sulfonilpropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_3^- \text{Na}^+$
CBA	Carboximetilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
DEA	Dietilaminopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{CH}_2 - \text{CH}_3)_2$
SAX	Trimetilaminopropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
PSA	N-Propiletlenodiaminossilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$
COVALENTE		
PBA	Ácido fenilborônico	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - $

Fonte: Queiroz; Collins; Jardim (2001).

Os discos são flexíveis e superficialmente lembram discos de filtro de papel. Eles são utilizados com uma estrutura de apoio, tal como um vidro poroso ou suporte de plástico. Membranas com partículas carregadas também estão disponíveis em um formato convencional de cartucho. Neste caso, o leito adsorvente contém partículas de um tamanho maior, cerca de 50 mm, de um disco mais espesso de cerca de um milímetro, selado na base de uma seringa aberta (POOLE, 2003).

Na técnica de conFiguração “on-line”, o sistema de extração em fase sólida está conectado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo frequentemente inserido na alça de amostragem, sendo conectado diretamente na linha de alta pressão da fase móvel que atua como eluente da amostra (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A microextração em fase sólida é uma técnica moderna onde é empregada uma fibra ótica, de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero ou de um adsorvente sólido. Esta fibra ótica, que é uma fase extratora, é acondicionada dentro da agulha de uma microseringa, para a extração dos analitos. Após a extração, os analitos presentes na fibra são dessorvidos termicamente pela sua introdução no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

3.7. Validação de Métodos Cromatográficos

Validação é uma avaliação do método utilizada a fim de se garantir que os resultados obtidos tenham confiabilidade.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) define: “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

No Brasil a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003) disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

O processo de validação consiste na avaliação de diferentes parâmetros, a saber: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

A seguir são descritas as definições de acordo com Ribani et al. (2004).

Seletividade: é a capacidade de avaliar substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

Ela pode ser avaliada através da comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a substância padrão, sendo que neste caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve ser bem separada dos demais compostos presentes na amostra.

Linearidade e faixa de aplicação: A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas da espécie. Essa relação pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva analítica. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuado usando o método matemático conhecido como regressão linear obtendo assim os coeficientes de regressão a e b, como também calcular o coeficiente de correlação r, que permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quando mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais.

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e o inferior da substância em exame que atenda aos requisitos de precisão e exatidão.

Precisão: representa a dispersão dos resultados de ensaios repetidos para mesma amostra ou padrão.

A precisão pode ser expressa pelo:

- 1 Desvio-padrão absoluto (Equação 5):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

Onde: $\bar{x}$ é a média aritmética de um pequeno número de medições;

x_i é o valor individual de uma medição e

n é o número de medições.

- 2 Desvio padrão relativo (coeficiente de variação, CV) (Equação 6):

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

- 3 Intervalo de confiança da média (IC) (Equação 7):

$$IC = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

Onde: t_{n-1} é o valor crítico da distribuição de Student com n-1 graus de liberdade. O valor t é Tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

A precisão pode ser expressa em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade representa a reprodução dos resultados de medições sucessivas efetuadas num curto espaço de tempo e sob as mesmas condições: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e mesmo local. A precisão intermediária indica a variação referente a alterações dentro do mesmo laboratório: dias diferentes, analistas diferentes ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade é o resultado de estudos de colaboração em que vários laboratórios analisam uma amostra em comum. Ela é importante para a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos no Codex Alimentarius ou em farmacopéias.

Exatidão: Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são, materiais de referência certificados (CRM), que podem ser adquiridos em órgãos reconhecidos, como o NIST (*National Institute of Standards and Technology – USA*), e são acompanhados de um certificado que possui o valor e a incerteza para a concentração de uma dada substância ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Outra forma de avaliação da exatidão é pela comparação dos resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência.

Outra avaliação são os ensaios de recuperação, definido como a quantidade de substância presente ou adicionado ao material de teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Ela deve ser avaliada adicionando-se a substância de interesse à matriz em estudo, em, pelo menos, três concentrações.

Método de adição de padrão também é outra ferramenta. No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância. A concentração da substância de interesse na amostra original pode ser determinada gráfica e matematicamente.

Limite de detecção: (LD) representa a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LD pode ser calculado de três maneiras:

Método visual: É utilizado para determinar o limite de detecção utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável).

Método da relação sinal-ruído: Comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

Método baseado em parâmetros da curva analítica: Podendo ser expresso como (Equação 8):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (8)$$

Onde: s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação.

S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Limite de quantificação: (LQ) representa a menor concentração da substância que pode ser quantificada.

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LQ, a partir da equação (Equação 9):

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (9)$$

Robustez: mede a sensibilidade de um método frente a pequenas variações, como o pH e a força iônica da fase móvel, programação de temperatura, tempo de extração, etc.

Neste trabalho serão apresentados os resultados obtidos para a validação da metodologia que será utilizada para a análise dos compostos de interesse e as próximas etapas que serão realizadas para a provável detecção e determinação dos analitos.

3.8. Legislação aplicada a Desreguladores Endócrinos

A legislação europeia (Plant Protection Products Regulation 1107/2009) (EC, 2009) criou certos critérios para apoiar apenas a comercialização e utilização de produtos químicos que não provoquem desregulação endócrina em seres humanos e espécies silvestres. Esta legislação exige que ativos endócrinos sejam geridos de forma diferente de outros produtos químicos, presumivelmente devido à falta de um limiar de efeitos adversos (LEWIS, 2013).

Na ausência de critérios científicos de como identificar e avaliar as substâncias que causam desregulação endócrina, o Centro Europeu de Ecotoxicologia e Toxicologia de Produtos Químicos (ECETOC, 2009) desenvolveu uma proposta baseada no impacto à saúde humana e ao meio ambiente (BARS et al., 2011). Efeitos que necessitam de análise mais aprofundada devem cumprir os três critérios: possuir um modo de ação endócrino, ter

efeito adverso, e ter relevância junto à população, para refletir o objetivo de proteção das avaliações ecotoxicológicas (WELTJE et al., 2013).

Além disso, uma vez que nem todos os produtos químicos com propriedades de desregulação endócrina apresentam o mesmo perigo, uma avaliação do potencial tóxico também foi proposta como uma segunda etapa para discriminar produtos químicos de alto e baixo impacto (BARS et al., 2012). Entretanto, é difícil conseguir discriminar entre alterações do sistema endócrino que são esperadas por respostas adaptativas e alterações que representem efeitos adversos. Respostas adaptativas são parte do funcionamento normal do sistema endócrino dentro do equilíbrio homeostático (capacidades fisiológicas do organismo de se adaptar). Os efeitos adversos são causados apenas quando as interferências com o sistema endócrino geram alterações não compatíveis com a função normal. Assim, uma perturbação da homeostasia do sistema endócrino normal por si só, não é um efeito adverso. Portanto, é evidente que, para um produto químico ser identificado como um DE, deve haver evidência de efeitos adversos nos estudos apicais e deve haver provas convincentes de que o efeito adverso é uma consequência de uma perturbação do sistema endócrino (DEKANT; COLNOT, 2013). Assim, o Comitê de Toxicologia de Produtos Químicos e Produtos de Consumo do Reino Unido (COT, 2012) propôs um procedimento que deve começar pela análise dos efeitos adversos potencialmente relacionados com DE. Na ausência de tais efeitos, uma substância é automaticamente classificada como “um não DE” (Figura 13).

A avaliação de risco à saúde humana, bem como a classificação e rotulagem de uma substância, deve estar baseada principalmente sobre os efeitos adversos com relevância biológica visto num organismo intacto. Estudos *in vitro* e *in vivo* contribuirão na elucidação de mecanismos relacionados aos efeitos observados. Para responder conclusivamente a questão da ocorrência de efeitos endócrinos em baixas doses há de se realizar um estudo toxicológico de alta qualidade com uma substância modelo para estabelecer um banco de dados inter laboratorial (DEKANT; COLNOT, 2013).

A presença de DEs no meio ambiente e seu potencial de causar danos à saúde humana e animal tem forçado o governo de vários países a desenvolver protocolos e procedimentos de teste, como o *Endocrine Disruptor Screening Program* (EDSP) da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), *Endocrine Disruptor Screening Program* (EDSP) da Agência Ambiental do Japão e o *Joint Working Group on*

Endocrine Disruptors Testing and Assessment (EDTA), patrocinado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). O EDSP desenvolveu ensaios *in vitro* e *in vivo* para identificar substâncias que possuam potencial de interação com os sistemas endócrinos (Tier 1) e, em seguida, desenvolveu relações de dose-resposta em modelos animais (Tier 2). O EDTA desenvolveu um quadro conceitual em cinco níveis para testes e avaliação de potenciais DEs, cada nível correspondendo a um nível diferente de complexidade biológica (HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

Figura 13: Fluxograma para avaliação das propriedades da "desregulação endócrina" para a saúde humana.

Fonte: Adaptado (DEKANT; COLNOT, 2013).

O governo canadense apoiou pesquisa institucional e acadêmica através da cooperação internacional para o desenvolvimento de método de ensaio normalizado para identificação dessas substâncias. Em 2010 foi publicada uma proposta para a regulamentação dos sistemas de tratamento de efluentes, visando a redução da descarga de micropoluentes associados às ETEs, com o emprego de tratamentos secundários ou equivalentes (HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

Na Europa, os esforços para classificar e regulamentar os DEs começaram em 1999. A União Europeia aprovou a "Community Strategy for Endocrine Disrupters" para empreender ações contra os desreguladores endócrinos. No âmbito desta estratégia, uma lista de 575 compostos suspeitos de serem DEs, publicados em diversos trabalhos e relatórios foram compilados. Em termos de prioridades, 320 dos 575 compostos mostraram evidência de desregulação endócrina. Em 2006, foi adaptado um regulamento relativo ao registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH) (Regulamento (CE) n.º 1907, 2006). De acordo com o REACH, as substâncias de maior impacto, como as cancerígenas, mutagênicas, tóxicas para a reprodução, persistentes e bioacumulativas, precisam de autorização ou substituição por uma substância alternativa adequada para uma determinada aplicação. Desde 2011, produtos que contenham substâncias que estão na lista de candidatos a DEs, devem ser comunicadas à Agência Europeia dos Produtos Químicos (HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

A despeito do que está ocorrendo nos países desenvolvidos o Brasil não possui nenhuma legislação, norma, protocolo ou procedimento que tente regulamentar a presença e disposição desses compostos no ambiente.

No Brasil, apenas uma pequena parte das águas residuais que é coletada recebe algum tipo de tratamento. Além disso, no Brasil a maior quantidade de água (75%) está localizada na região Amazonas na extremidade norte do território nacional. A região sudeste densamente povoada representa apenas 6% da superfície da água disponível, e destina-se a uma série de utilizações, tais como irrigação, processos industriais e produção de água potável. Nesta região, as políticas de saneamento são baseadas em coleta de esgoto bruto, com ou sem tratamento e despejados em rios adjacentes o que contribui para a ocorrência de uma série de contaminantes. No entanto, as investigações sobre a presença de contaminantes emergentes, como o estrogênio ou xenoestrogênios nas águas superficiais brasileiras são muito escassas (SODRÉ et al., 2010).

De acordo com a última pesquisa nacional sobre saneamento básico realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Política (IBGE, 2008), 55,2% dos municípios brasileiros tinham serviço de esgotamento sanitário por rede coletora de esgoto sendo que destes, 68,8% tinham algum tipo de tratamento do esgoto coletado. No Brasil, apenas 28,5% dos municípios fizeram tratamento de seu esgoto em 2008 (Figura 14).

No estudo realizado por Sodré; Locatelli; Jardim (2010), foi revelada a presença de seis compostos em amostras de água potável na cidade de Campinas, Brasil. Os compostos encontrados foram cafeína, colesterol, bisfenol-A e estigmasterol, como os mais frequentes e estrona e 17 β -estradiol foram detectados somente no período da seca. As concentrações para os compostos detectados com maior frequência (cafeína na concentração de $0,22 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ e bisfenol-A na concentração de $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$) foram maiores que os níveis encontrados em matrizes semelhantes ao redor do mundo. Claramente, este aspecto confirma o papel das descargas de esgoto bruto em ditar os níveis de bisfenol-A em água potável na região.

Figura 14: Percentual de municípios que coletam e tratam esgoto, por Grandes Regiões-2008.

Fonte: IBGE (2008).

No Brasil vigora a Portaria nº 2.914 do Ministério Da Saúde de 12 de dezembro de 2011, a qual estabelece os procedimentos para o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (Ministério da Saúde, 2011). Para atender as exigências dessa portaria, as ETEs possuem programas rotineiros de monitoramento químico e biológico, mas não de monitoramento para os microcontaminantes emergentes. Assim, uma água que atenda as exigências químicas e biológicas da portaria, não necessariamente está livre da contaminação de outros compostos incluindo os DEs e outros tipos de substâncias químicas.

Como visto, processos biológicos de tratamento de esgoto não são eficientes para a completa remoção dos micropoluentes. No Brasil muito ainda precisa ser feito no que se

refere a saneamento básico. De tal modo, investimentos em extensão com em tecnologias terciárias de tratamento seriam imprescindíveis para a diminuição dos impactos negativos gerados por essas substâncias no meio ambiente.

Em concordata aos países desenvolvidos, a criação de leis que regularizem tanto a comercialização, como a descarga dos DEs ou produtos que contenham DEs em corpos hídricos receptores de efluente das ETEs, são indispensáveis para a garantia da saúde animal e humana, visando também os impactos ambientais.

4 Materiais e Métodos

4.1. Materiais

- Vidraria de uso comum em laboratório (béquer, erlenmeyer, pipeta, balão volumétrico);
- Sistema de filtração à vácuo;
- Seringa de vidro de 10 mL, fabricada pela Arti Glass;
- Unidade filtrante MILLEX Durapore HV 0,45 μm , 25 mm diâmetro, não estéril;
- Pré-coluna (Prontosil 120-5-C18-AQ Guard/4.0 mm) Metrohm;
- Coluna C18 (Prontosil 120-5-C18-AQ-150/4.0 mm), tamanho da partícula: 5 μm
- Vidros âmbar (4L e 1L);
- Filtros de fibra de vidro de 1,2 μm de diâmetro de poro, Membrane Solutions;
- Filtros de ésteres de celulose de 0,45 μm de diâmetro de poro, Millipore;
- Cartucho para extração em fase sólida C18 de 500 mg e 3 mL, MS.

4.2. Equipamentos

- Balança analítica modelo AY 220, Shimadzu;
- Cromatógrafo líquido (modelo 850 Professional IC-Metrohm) e detector UV/VIS (modelo 887 Professional UV/VIS-Metrohm);
- Compressor-aspirador modelo CA BF-1493, Hipperquímica;
- Manifold para extração fase sólida, com 12 posições, AGILENT HP;
- Manifold para extração fase sólida, com 12 posições, SUPELCO;
- Medidor multiparâmetros portátil (HANNA Instruments, modelo: 61608);

4.3. Reagentes e Padrões

- Metanol (grau HPLC) e acetonitrila (grau HPLC) Sigma-Aldrich;
- Hexano (grau HPLC) Lab Guard;
- Acetona (grau HPLC) da Vetec;
- Acetonitrila (grau HPLC) da Sigma-Aldrich;
- Água deionizada obtida do sistema Milli-Q plus MILLIPORE;
- Padrões de Estrona e Bisfenol-A com 99% de pureza, Sigma-Aldrich;
- Padrões de β -estradiol e 17α -etinilestradiol com 98% de pureza, Sigma-Aldrich;

4.4. Validação do Método para Determinação dos DEs por HPLC-UV

Foram preparadas soluções padrões de estoque dos analitos de interesse na concentração de 1000 mg.L^{-1} . Foram pesadas separadamente 0,01 g de BFA, E2, EE2 e E1, como precisão analítica de 0,0001 g. Cada composto foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10,00 mL avolumado com acetonitrila 99,9 % (ACN). As soluções estocadas a 4°C em refrigerador, protegidas da luz.

Em seguida, 100 μL de cada padrão foram transferidos para um balão de 10,00 mL e avolumados com ACN. Foi injetada uma alíquota de 90 μL de cada solução em um cromatógrafo (Metrohn) equipado com detector UV. Os compostos foram eluídos em uma coluna C18 usando uma mistura inicial de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (8:2 v/v) em um gradiente linear até atingir em 15 minutos a razão (3:7 v/v). A vazão de eluição foi de $1,2 \text{ mL.min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi mantida em 25°C com um tempo de equilíbrio de aproximadamente 15 minutos. Os compostos foram detectados por UV em 280 nm.

A partir da determinação dos tempos de retenção de cada composto foi preparada uma solução a partir da transferência de uma alíquota de 100 μL da solução estoque de cada padrão para um balão volumétrico de 10,00 mL avolumado com ACN (10 ppm). A solução foi homogeneizada e uma alíquota de 90 μL foi injetada no cromatógrafo nas mesmas condições descritas acima, exceto para o comprimento de onda que foi mudado para 230 nm, para a determinação da relação sinal-ruído. Os Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ) de cada analito, foram então determinados a partir da

injeção de alíquotas de 90 µL, preparadas a partir da diluição da solução de 10 ppm, até que a relação sinal-ruído atingisse o a razão de 3 e 10 respectivamente. A partir da concentração determinada pelo LQ foi construída uma curva de calibração contendo os analitos nas concentrações mostradas na Tabela 4. As injeções das amostras no cromatógrafo foram realizadas em triplicata. A linearidade do método foi determinada através do cálculo do coeficiente de correlação (r^2).

Tabela 4: Concentrações dos sete pontos da curva analítica (mg.L^{-1}) construída para a validação do método cromatográfico para a determinação de BFA, E2, EE2 e E1.

	BFA	E2	EE2	E1
1	0,12	0,33	0,26	0,35
2	0,50	0,50	0,50	0,50
3	0,80	0,80	0,80	0,80
4	1,00	1,00	1,00	1,00
5	2,00	2,00	2,00	2,00
6	3,00	3,00	3,00	3,00
7	4,00	4,00	4,00	4,00

Fonte: Arquivo pessoal.

Para validação do método de extração, foram testadas quatro condições diferentes, de acordo com a metodologia modificada descrita por (BILA, 2005; LIZ; NAGATA; PERALTA-ZAMORA, 2012; MOURA, 2009). Todas com sistemas envolvendo C-18 como fase estacionária.

A Tabela 5 mostra as condições utilizadas para a realização dos testes de extração.

Foram preparadas 4 amostras diferentes, cada uma em 1 L de água destilada. Todas as amostras foram fortificadas com alíquotas de 50 µL da solução estoque de 1000 ppm. As amostras fortificadas foram submetidas ao *aging* (envelhecimento) durante 12 horas, a 4° C, sob proteção da luz para promover a interação dos analitos com a água e seus componentes. Em seguida a amostra foi eluída pelo cartucho C18 do sistema de extração previamente condicionado. A vazão da amostra foi de aproximadamente 10 mL.min^{-1} . Após a passagem da amostra foi realizado um *clean up* do cartucho, pela passagem de 10 mL de uma solução de metanol:água (1:9), para a retirada de possíveis interferentes. O cartucho foi seco sob vácuo por 10 min e em seguida foi feita a eluição de acordo com as condições mostradas na Tabela 5. Após a eluição, o solvente foi seco com nitrogênio (N_2). As amostras foram ressuspensas em 10,00 mL de acetonitrila, exceto para o método de número 4, cuja a eluição foi realizada em acetonitrila e avolumada em um balão de 10 mL.

Tabela 5: Condicionamentos utilizados para os testes de extração em fase sólida com água fortificada destilada.

Método	Volume da amostra	Massa do adsorvente	Condicionamento do cartucho	Eluição
1	1 litro	500 mg	6 mL de Hexano 2 mL de Acetona 6 mL de Metanol 10 mL de água (pH 3)	4 mL de Acetona
2	1 litro	500 mg	6mL de Hexano 2 mL de Acetona 6 mL de Metanol 10 mL de água (pH3)	8 mL de Acetona
3	1 litro	500 mg	2 mL de Acetona 6 mL de Metanol 10 mL de água (pH3)	4 mL de Metanol
4	1 litro	500 mg	7 mL de Acetonitrila 5 mL de Metanol 5 mL de água (pH3)	4 mL de Acetonitrila

Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida, o extrato foi filtrado em membrana de vidro com poros de 0,45 μm de diâmetro e analisados por cromatografia nas mesmas condições descritas anteriormente. A Figura 15 mostra o sistema de extração utilizado.

Figura 15: Sistema de Extração em Fase Sólida (EFS) utilizado para a validação do método.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 16 mostra o esquema do método utilizado.

Figura 16: Esquema simplificado utilizado para a validação do método de extração.

Fonte: Arquivo pessoal.

O testes preliminares consistiram na fortificação de água destilada em concentração de 5 mg.L^{-1} para todos os analitos. Posteriormente foi selecionado o método que apresentou melhor desempenho usando os critérios de recuperação entre 70 e 120% com coeficiente de variação (CV) menor que 20% para as repetições (RIBANI, 2004).

Em seguida foram realizados os estudos de recuperação dos analitos a fim de se determinar a exatidão e precisão descritas por Ribani (2004). Foram feitos ensaios de fortificação em três concentrações diferentes (alta, média e baixa), sendo que cada concentração foi realizada em triplicata (Tabela 6). Para estes testes foi utilizado água de torneira do Departamento de Biotecnologia Industrial da EEL-USP, que consiste em água subterrânea sem tratamento. Posteriormente foi realizada a extração e a análise cromatográfica em triplicata como descrito anteriormente.

Tabela 6: Concentrações de fortificação utilizadas para os estudos de exatidão e precisão do método.

Concentração	BFA	E2	EE2	E1
Baixa	0,22 mg.L ⁻¹	0,43 mg.L ⁻¹	0,36 mg.L ⁻¹	0,45 mg.L ⁻¹
Média	2,00 mg.L ⁻¹	2,00 mg.L ⁻¹	2,00 mg.L ⁻¹	2,00 mg.L ⁻¹
Alta	4,00 mg.L ⁻¹	4,00 mg.L ⁻¹	4,00 mg.L ⁻¹	4,00 mg.L ⁻¹

Fonte: Arquivo pessoal.

A seletividade do método também foi avaliada através da extração de duas amostras de água. Em um teste foi utilizado amostra de água subterrânea e no outro, amostra de água superficial do córrego do Ribeirão Benfica da cidade de Piquete. Antes da análise, o pH da água de torneira, foi ajustado para 2 e em seguida foi feita a extração. Posteriormente a mesma foi eluída, filtrada e analisada por cromatografia. Já para a análise da água superficial a amostra foi filtrada em membrana de vidro de 1,2 µm e membrana de ésteres de celulose de 0,45 µm antes do procedimento de extração. Em seguida foi realizado o mesmo procedimento da amostra de água de torneira.

4.5. Coleta das Amostras

Inicialmente, foram feitas duas coletas “testes” no Rio Paraíba do Sul em um ponto próximo a Escola de Engenharia de Lorena nos meses de novembro e dezembro de 2014. Os procedimentos usados para a realização das coletas foram os mesmos que serão descritos a seguir para as coletas feitas na cidade de Aparecida-SP. Posteriormente, coletas foram realizadas no Rio Paraíba do Sul no município de Aparecida - SP, próximo ao ponto de captação de água para abastecimento público da cidade (S22.84468° O45.23627°) que se encontra a aproximadamente 50 m a jusante do descarte de efluente da Basílica e bairros próximos (Figura17).

Foi realizada uma campanha de amostragem semanal entre os meses de abril e julho de 2015. Foram coletadas um total de 51 amostras.

As coletas foram efetuadas retirando-se água da superfície, a 0,60 m 1,20 m de profundidade a qual corresponde a profundidade máxima do rio no ponto de coleta.

Foram coletados 4 L de água de cada profundidade, totalizando 3 amostras por coleta.dia⁻¹. Para a realização das coletas foi utilizado a garrafa de Van Dorn (Figura 18), o que permitiu que a coleta fosse feita em diferentes profundidades. A água coletada foi transferida para frascos de vidro âmbar de 4 L previamente limpos e rinsados com a água do rio no momento da coleta. As amostragem foram efetuadas sempre entre 11:00 e 12:00 hs. No momento da coleta, foram medidos os parâmetros de pH, condutividade, turbidez e temperatura da amostra nas três diferentes profundidades, utilizando um medidor multiparâmetros portátil.

Figura 17: Fotografias da região do ponto de coleta das amostras. 1- plataforma onde é feita a captação de água para abastecimento. A seta marca o ponto de descarte de efluente. 2- ponto de descarte de efluente no Rio Paraíba.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 18: Foto da garrafa de Von Dorn utilizada na coleta.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para conservar as amostras foram adicionados 40 mL de metanol em cada garrafa (10 mL.L⁻¹). As amostras foram transportadas ao laboratório em bolsa isotérmica com gelo e protegidas da luz. No laboratório as amostras foram mantidas em geladeira a 4°C e protegidas da luz até a sua manipulação, sendo tratadas em até 72 hs.

Posteriormente as amostras foram filtradas em fibra de vidro e filtro de ésteres de celulose de 1,2 µm e 0,45 µm de porosidade respectivamente. Em seguida as amostras foram acidificadas com ácido sulfúrico até pH 2 e extraídas em cartuchos C18 (2L de amostra por cartucho) previamente condicionados. A retirada de interferentes presentes nas amostras foi realizado por *clean up* do cartucho. Os cartuchos foram secos pela passagem de ar no sistema por 10 minutos. O sistema de extração utilizado é mostrado na Figura 19. Finalmente os cartuchos foram congelados e protegidos da luz até o momento da análise cromatográfica.

Figura 19: Imagem do sistema de extração utilizado para percolar as amostras em cartucho C18.

Fonte: Arquivo pessoal.

Antes das análises cromatográficas, os cartuchos foram descongelados e eluídos pela passagem 4 mL de ACN. O eluato foi recolhido em tubo de vidro e a amostra foi seca sob fluxo de N₂ até segura e posteriormente ressuspensos em 1,00 mL de acetonitrila. A

amostra foi filtrada em fibra de vidro de 0,45 μm e analisada por cromatografia nas condições descritas no item 4.4.

4.6. Análises Estatísticas

O grau de associação entre as variáveis ambientais e a concentração dos analitos foi avaliado em teste não paramétrico, através do Coeficiente de Correlação de Spearman com nível de significância de $p < 0,05$. Foi utilizado o pacote estatístico Statistica 7[®].

As variáveis também foram analisadas através da Análise dos Componentes Principais (ACP) a fim de identificar os componentes mais importantes na formação dos padrões espaciais e sazonais nos locais de estudo. Esta análise é indicada para conjuntos de medidas correlacionadas linearmente, podendo ser reduzidas a poucas variáveis sintéticas (componentes principais).

Em outras palavras, a ACP foi aplicada para determinar quantos componentes principais foram relevantes para esse estudo e verificar se houve correlação estatística entre os parâmetros analisados através dos resultados obtidos das amostras de água. Foi utilizado o pacote estatístico PAST version 2.16[®].

As variáveis estudadas foram: precipitação pluviométrica, radiação ultra violeta (UV), pH, temperatura da água e número de visitantes presentes na cidade no dia anterior a coleta, em função da concentração dos DEs encontrados nas amostras.

5 Resultados e Discussões

5.1. Validação do Método Cromatográfico para Determinação dos DEs

Na Figura 20 são mostrados os cromatogramas representativos da separação do BFA, E2, EE2 e E1, detectados por UV em 230 e 280 nm, respectivamente. Os cromatogramas mostram que, a separação entre os compostos estudados foi adequada. O tempo de retenção nesses cromatogramas para o BFA, E2, EE2 e E1 foi de 10,47, 11,00, 11,91, 12,31 min, respectivamente.

Inicialmente foi utilizado o comprimento de onda de 280 nm, tendo como base o estudo feito por Verbinen; Nunes; Vieira (2010) e a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Porém, outros trabalhos como o de Spohr et al. (2014) relatam uma melhor absorbância em 230 nm. Assim, foi realizada uma varredura do espectro no qual se verificou absorbância maior desses compostos em 230 nm. A sensibilidade obtida em 230 nm foi bem maior do que a utilizada em 280 nm. Isto pode ser visto através da intensidade do sinal mostrado nos cromatogramas (Figura 20). Em 230 nm o LD e LQ foram bem menores do que os obtidos em 280 nm como pode ser visto comparando os resultados na Tabela 7. O LD do BFA foi de 0,140 para 0,036 mg.L⁻¹ quando o comprimento de onda no detector variou de 280 para 230 nm, aumentando em cerca de 4 vezes a sensibilidade do método. O aumento de sensibilidade do método também foi observado para os outros compostos. Para o E2, EE2 e E1 a sensibilidade aumentou 7,4 e 3 vezes, respectivamente. O aumento de sensibilidade equivalente também foi determinado para o LQ em 230 nm. A sensibilidade mais que triplicou para o BFA, E2 e E1 e aumentou sete vezes para EE2 (Tabela 7).

A partir dos resultados obtidos foi escolhido o comprimento de onda de 230 nm para a realização de todas as determinações dos DEs estudados.

Tendo selecionado as condições ideais, as misturas de hormônios foram injetadas no sistema e o LD e LQ foram determinados através da relação sinal ruído. O intervalo de trabalho também foi determinado, sendo o primeiro ponto da curva igual ao LQ.

O Sistema cromatográfico forneceu informações sobre a curva analítica e sua linearidade através do cálculo do coeficiente de correlação (r^2) (Tabela 7).

A linearidade do método se mostrou satisfatório, com coeficiente de correlação próximo de um e acima do valor recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 0,99 (Tabela 7) (ANVISA, 2003).

Figura 20: Cromatogramas obtidos para a separação dos padrões dos BFA, E2, EE2 e E1. A- cromatograma em 230nm; B- cromatograma em 280 nm.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 7: Intervalo de trabalho (mg.L^{-1}), limite de detecção (mg.L^{-1}), limite de quantificação (mg.L^{-1}) e coeficiente de correlação das curvas de calibração dos estrogênios em 230 e 280 nm. Legenda: IT_{230} = intervalo de trabalho em 230 nm, LD_{230} = limite de detecção em 230 nm, LQ_{230} = limite de quantificação em 230 nm, r^2_{230} = coeficiente de correlação em 230 nm, IT_{280} = intervalo de trabalho em 280 nm, LD_{280} = limite de detecção em 280 nm, LQ_{280} = limite de quantificação em 280 nm, r^2_{280} = coeficiente de correlação em 280 nm.

DE	IT_{230}	LD_{230}	LQ_{230}	r^2_{230}	IT_{280}	LD_{280}	LQ_{280}	r^2_{280}
BFA	0,120 - 4,000	0,036	0,12	0,999635	0,500-10,000	0,140	0,700	0,999947
E2	0,330 - 4,000	0,099	0,330	0,998475	0,500-10,000	0,738	1,110	0,998512
EE2	0,260 - 4,000	0,078	0,260	0,997965	0,500-10,000	0,329	1,660	0,999731
E1	0,350 - 4,000	0,105	0,350	0,998811	0,500-10,00	0,360	1,000	0,999763

Fonte: Arquivo Pessoal.

A Figura 21 exemplifica a curva de calibração para determinação de BFA.

Figura 21: Curva de calibração obtida na determinação de BFA.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Uma vez que as condições cromatográficas foram selecionadas, partiu-se para a otimização do método de extração utilizando C18 como fase estacionária. Para aperfeiçoar as condições da extração foram testadas quatro condições diferentes em água destilada fortificada. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8.

Como pode ser observado, os analitos E2, EE2 e E1, mostraram porcentagem de recuperação (exatidão) e coeficiente de variação (CV) (precisão) satisfatórios em todas as condições. A taxa de recuperação recomendável é de 70 a 120% e CV menor que 20% de acordo com Ribani (2004).

Tabela 8: Resultados obtidos para os testes de recuperação da extração em fase sólida, utilizando quatro diferentes métodos. CV= coeficiente de variação.

Método	BFA	E2	EE2	E1
1 Recuperação	28,90%	81,26%	83,64%	82,32%
CV	23,00%	0,10%	2,30%	0,60%
2 Recuperação	39,16 %	101,41%	97,24%	103,36%
CV	29,67%	1,07%	3,29%	2,31%
3 Recuperação	32,24%	95,92%	97,82%	99,30%
CV	19,84%	10,35%	6,34%	3,97%
4 Recuperação	50,24%	106,18%	102,88%	92,52%
CV	5,83%	0,79%	0,53%	0,32%

Fonte: Arquivo Pessoal.

No entanto em todas as condições testadas o analito bisfenol-A não mostrou porcentagem de recuperação na faixa recomendável. O melhor resultado foi obtido no

método 4 (50,04%). Como nesse procedimento o CV foi menor que 20% (5,83), esse procedimento foi escolhido para a realização dos ensaios para determinação precisão e exatidão do método. Os ensaios foram realizados em diferentes concentrações de fortificação da amostra (baixa, média e alta) como descritos no item 4.4. Cada concentração foi realizada em triplicata. Cada solução foi injetada também em triplicata no cromatógrafo. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 22.

Os analitos E2, EE2 e E1 tiveram recuperação (exatidão) satisfatória estando na faixa recomendável de 70 a 120% com coeficiente de variação (precisão) também aceitável ficando abaixo de 20%. Contudo, a recuperação do bisfenol-A ficou entre 58,93% e 65,91% com coeficiente de variação abaixo de 20%. No entanto, Brito et al. (2003) consideram uma recuperação aceitável entre 40 e 120% para amostras complexas presente em baixas concentrações, como é o caso desse tipo de amostra. Já Montagner; Jardim (2011) obtiveram recuperações de 50-98% em fortificação de 1 mg.L⁻¹, o que também foi considerado aceitável devido a complexidade da matriz.

Figura 22: Recuperação e coeficiente de variação (CV).

Fonte: Arquivo Pessoal.

A seguir, (Figura 23) é apresentado cromatograma referente a um dos ensaios de recuperação efetuados para água subterrânea juntamente com a amostra-testemunha (não fortificada com os padrões).

Figura 23: Exemplo de cromatogramas dos testes de recuperação da extração em fase sólida. A: Cromatograma de água subterrânea fortificada no nível baixo e B: Cromatograma de água subterrânea sem fortificação.

Fonte: Arquivo pessoal.

A seletividade do método também se mostrou adequada com a amostras feitas de água subterrânea e superficial com nenhum pico no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse (Figura 24).

Figura 24: Seletividade. A- água superficial. B- água subterrânea.

Fonte: Arquivo pessoal.

O método foi validado e se mostrou adequado para a análise dos compostos Bisfenol-A, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e Estrona.

5.2. Determinação de DEs no Rio Paraíba do Sul nas cidades de Lorena e Aparecida

Os resultados preliminares obtidos em duas amostragens de águas retiradas da superfície do Rio Paraíba do Sul, realizadas nos meses de novembro e dezembro de 2014 na cidade de Lorena, mostraram a presença de E2 e E1 nas concentrações de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 0,1$ e $0,16 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 0,03$, respectivamente no mês de novembro. No mês de dezembro as concentrações de E2 e E1 foram de $0,24 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 0,03$ e $0,44 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 0,02$, respectivamente. As concentrações determinadas foram consideradas muito altas quando comparadas aquelas reportadas na maioria dos trabalhos consultados na literatura, como será evidenciado nos resultados que serão relatados posteriormente. Esse fato fez com que os objetivos iniciais do projeto fossem revistos. A alta concentração desses dois estrogênios abriu uma nova hipótese de trabalho que estaria, relacionado a presença de DEs em pontos de captação de água para abastecimento público e suas possíveis implicações relativas a saúde pública dos consumidores abastecidos por água captadas no Rio Paraíba do Sul. A partir de então, o ponto de coleta das amostras foi redirecionado para a cidade de Aparecida que capta água para abastecimento público localizado aproximadamente a 50 m a jusante do efluente gerado na Basílica e bairros circunvizinhos. A partir de então passou a se coletar amostras de água semanalmente no período de abril a julho de 2015, num total de 17 coletas realizadas em três profundidades: superfície, 0,60m e 1,20 m, totalizando 51 amostras analisadas. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Devido as possíveis diferenças de densidade dos DEs, as coletas foram realizadas em três diferentes profundidades, com o intuito de averiguar a existência da relação entre densidade, concentração e profundidade do rio. A variação das médias de cada analito em diferentes profundidades é apresentado na Figura 25 e um exemplo dos cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 26. Os resultados mostraram não haver correlação entre elas, como pode ser visto pelas barras de erro, provavelmente devido ao nível de turbulência das águas do Rio Paraíba do Sul.

Tabela 9: Concentrações determinadas de BFA, E2, EE2 e E1 em amostras de água do Rio Paraíba do Sul coletadas na cidade de Aparecida em diferentes profundidades: 1= superficial, 2= 0,60 m e 3 1,20 m. LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação e ND- não detectado.

DIA	BFA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			EE2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			E1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
06/abr	<LD	<LD	0,084 $\pm 0,009$	<LQ	0,09 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	0,11 $\pm 0,02$	0,10 $\pm 0,01$	0,306 $\pm 0,006$	0,43 $\pm 0,02$	0,35 $\pm 0,02$
13/abr	<LQ	<LD	<LD	0,20 $\pm 0,05$	0,24 $\pm 0,06$	0,14 $\pm 0,05$	<LQ	ND	ND	<LQ	0,116 $\pm 0,003$	0,107 $\pm 0,008$
22/abr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27/abr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,28 $\pm 0,12$	ND	0,46 $\pm 0,07$
04/mai	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,40 $\pm 0,02$	0,32 $\pm 0,05$	0,36 $\pm 0,07$
11/mai	0,088 $\pm 0,006$	0,060 $\pm 0,007$	ND	0,23 $\pm 0,06$	0,15 $\pm 0,05$	ND	ND	ND	0,19 $\pm 0,02$	0,46 $\pm 0,09$	0,36 $\pm 0,08$	0,50 $\pm 0,02$
18/mai	<LQ	<LQ	<LQ	0,40 $\pm 0,08$	ND	ND	ND	ND	ND	0,40 $\pm 0,09$	0,6 $\pm 0,1$	0,70 $\pm 0,09$
25/mai	<LQ	ND	0,073 $\pm 0,008$	<LQ	ND	ND	0,07 $\pm 0,01$	ND	<LQ	0,40 $\pm 0,09$	0,51 $\pm 0,07$	0,81 $\pm 0,04$
01/jun	<LD	<LD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,82 $\pm 0,04$	0,75 $\pm 0,08$	0,8 $\pm 0,1$
08/jun	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,35 $\pm 0,08$	0,24 $\pm 0,08$	0,28 $\pm 0,10$	0,63 $\pm 0,02$	0,76 $\pm 0,07$	0,8 $\pm 0,1$
15/jun	<LQ	<LQ	<LQ	0,13 $\pm 0,04$	<LQ	0,09 $\pm 0,02$	0,19 $\pm 0,04$	<LQ	0,3 $\pm 0,1$	0,58 $\pm 0,07$	0,7 $\pm 0,1$	0,7 $\pm 0,1$
22/jun	<LQ	<LQ	0,05 $\pm 0,01$	0,10 $\pm 0,01$	0,21 $\pm 0,02$	0,11 $\pm 0,08$	0,15 $\pm 0,10$	0,19 $\pm 0,06$	0,18 $\pm 0,08$	0,59 $\pm 0,07$	0,6 $\pm 0,2$	0,9 $\pm 0,1$
29/jun	<LQ	<LQ	<LQ	0,31 $\pm 0,06$	<LQ	0,12 $\pm 0,04$	0,2 $\pm 0,1$	0,22 $\pm 0,06$	0,3 $\pm 0,1$	0,55 $\pm 0,09$	0,57 $\pm 0,01$	0,69 $\pm 0,07$
06/jul	0,035 $\pm 0,003$	0,04 $\pm 0,01$	0,032 $\pm 0,009$	0,16 $\pm 0,04$	<LQ	0,12 $\pm 0,06$	0,60 $\pm 0,10$	0,45 $\pm 0,06$	0,46 $\pm 0,01$	0,85 $\pm 0,01$	0,88 $\pm 0,05$	0,91 $\pm 0,07$
13/jul	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,19 $\pm 0,05$	0,192 $\pm 0,006$	<LQ	0,45 $\pm 0,04$	0,42 $\pm 0,07$	0,6 $\pm 0,3$
19/jul	<LQ	<LQ	<LQ	0,11 $\pm 0,04$	0,11 $\pm 0,03$	0,091 $\pm 0,003$	0,12 $\pm 0,01$	<LQ	0,32 $\pm 0,05$	0,36 $\pm 0,07$	0,37 $\pm 0,04$	0,74 $\pm 0,02$
27/jul	<LQ	<LQ	<LQ	0,14 $\pm 0,02$	ND	<LQ	0,17 $\pm 0,01$	ND	ND	0,29 $\pm 0,04$	0,32 $\pm 0,02$	0,260 $\pm 0,003$

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados mostram que os DEs estudados só não foram detectados nas amostras coletadas em 22 de abril de 2015. A Estrona foi encontrada em concentrações mais altas, ao menos duas profundidades nas outras 16 coletas realizadas.

O BFA foi detectado em 65,7% das amostras. Em 49% destas, ficou abaixo do LQ e acima do LD. Foi efetivamente detectado em 16,7% das amostras com valores variando de $0,032 \pm 0,009$ a $0,088 \pm 0,06 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Figura 25: Variação das médias das concentrações dos analitos em diferentes profundidades. (1)= amostras de água da superfície, (2)= amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade, (3)= amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 26: Exemplo dos cromatogramas obtidos nas coletas. A: coleta superficial (13-jun); B: coleta a 0,60 m de profundidade (13-abr); C: coleta a 1,20 m de profundidade (26-jun).

Fonte: Arquivo pessoal.

O E2 foi detectado em 64,7% das amostras. Em 25,5% ficou abaixo do LQ e acima do LD. Foi efetivamente detectado em 39,2% das amostras com valores variando de $0,009 \pm 0,002$ a $0,40 \pm 0,08 \mu\text{g.L}^{-1}$.

O EE2 não foi detectado em 56,9% das amostras. Em 11,8% ficou abaixo do LQ. Foi efetivamente detectado em 45,1% das amostras com valores variando de $0,07 \pm 0,01$ a $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$.

O E1 não foi detectado em 92,2% das amostras. Em 2% ficou abaixo do LQ. Foi efetivamente detectado em 90,2% das amostras com valores variando de $0,107 \pm 0,08$ a $0,91 \pm 0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$.

De longe a E1 foi o composto detectado em maior frequência e em maiores concentrações nesse estudo. A concentração média calculada para E1 foi de $0,534 \pm 0,047$

$\mu\text{g.L}^{-1}$. O BFA e E2 foram detectados na mesma frequência e as concentrações médias calculadas foram de $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. O composto encontrado com menor frequência foi o EE2, cuja a concentração média foi de $0,241 \pm 0,007 \mu\text{g.L}^{-1}$.

A ocorrência desses DEs no trecho médio superior do rio Paraíba do Sul, tem sido atribuído ao descarte de esgoto com ou sem tratamento em ambientes aquáticos (GÜLTEKIN; INCE, 2007; HAMID; ESKICIOGLU, 2012; HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006). As concentrações determinadas podem ser consideradas altas e se equiparam as encontradas em outros trabalhos descritos na literatura, como poderá ser verificado na sequência dessa discussão.

Gorga; Petrovic; Barceló (2013) detectaram em águas superficiais do Rio Ebro (Espanha), concentrações de BFA de 61 ng.L^{-1} , as quais foram similares as relatadas nessa dissertação. No entanto, concentrações cerca de 50 vezes maiores (2.970 ng.L^{-1}) foram reportadas por Céspedes et al. (2005) no Rio Llobregat nesse mesmo país.

Esteban et al. (2014) detectaram BFA em 71% das amostras analisadas no Rio Jarama na região de Madri na Espanha com concentrações máximas chegando a $0,126 \mu\text{g.L}^{-1}$. Concentrações similares foram encontrados em outros estudos, tais como o de de Ballesteros-Gómez et al. (2007) no Rio Guadalquivir e seus afluentes (Espanha), com valores médios de $0,100 \mu\text{g.L}^{-1}$.

No Brasil, Moreira et al. (2011) analisaram amostras coletadas no Rio das Velhas em Minas Gerais. O BFA foi encontrado em todas as amostras, em diferentes locais de amostragem, em concentrações que variaram de $8,6$ - $168,3 \text{ ng.L}^{-1}$.

Alguns estudos foram realizados na região metropolitana de Campinas em especial na bacia do Rio Atibaia. Sodré et al. (2007) detectaram BFA em concentrações que variaram de $0,005$ a $1,760 \mu\text{g.L}^{-1}$. Em um estudo posterior, a faixa de concentração do BPA variou entre 25 e 84 ng.L^{-1} (SODRÉ et al., 2010), enquanto a faixa determinada por Montagner; Jardim (2011) variou $13,016$ a 204 ng.L^{-1} para amostras coletadas no período de estiagem.

As fontes de BFA são principalmente os efluentes produzidos em fábrica de plástico e sua decomposição no ambiente, que acabam sendo descartados nas ETEs, como registrado por Fromme et al. (2002) que o detectaram em concentrações na faixa de 0,018 a 0,702 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Da mesma maneira, Ferreira, (2013) detectou altas concentrações em efluente de ETEs da Penha e da Ilha do Governador, RJ, determinadas por LC-MS/MS e pelo método Elisa, cujos valores oscilaram entre 1,77 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 4,44 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e 3,32 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 5,13 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. O autor reportou ainda que Heisterkamp et al. (2004) também detectaram em amostras de efluentes ETEs concentrações altas entre 0,085 e 28 $\mu\text{g.L}^{-1}$, cuja a média foi de 6,09 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

A presença de picos de outros compostos não identificados (Figura 27), nos cromatogramas analisados nessa dissertação, põe em dúvida a existência de produtos de degradação deste analito. Entretanto a confirmação dessa hipótese carece de mais estudos envolvendo a degradação do BFA, como também a determinação da atividade estrogênica de seus metabólitos.

Figura 27: Cromatograma exemplo mostrando os possíveis produtos de degradação do BFA.

Fonte: Arquivo pessoal.

A biodegradação do BFA foi investigada em um trabalho que utilizou quarenta e quatro diferentes microcosmos, preparados a partir de águas retiradas de diferentes rios, em condições que variaram de "limpo" para "pesadamente poluído". A degradação foi observada em quarenta deles, sendo que em seis foi observada a mineralização completa do BFA. Os resultados mostraram ainda, que a tendência à degradação foi maior em ambientes mais poluídos. Nos microcosmos que proporcionaram degradação parcial, foram detectados metabólitos. Outra variável estudada foi o efeito da temperatura. Na faixa de 20

a 30 °C ocorreu mineralização completa do composto depois de um período de 10 a 15 dias (EU, 2009). Esses dados fornecem evidências sobre o caráter não persistente dessa substância. Entretanto, a entrada contínua do BFA no ambiente o faz frequentemente detectado em águas superficiais.

Pelayo et al. (2011) detectaram E1 e E2 no Rio Llobregat (Espanha) em concentrações de até 560 ng.L⁻¹ e 130 ng.L⁻¹, respectivamente, cujo os valores são muito próximos aos encontrados no presente estudo.

Moreira et al. (2009) analisaram a presença de EE2 e E2 em fontes de água da região metropolitana de Belo Horizonte, responsáveis por 58% do abastecimento de água da região. E2 foi detectada em 14 das 72 amostras de água bruta e foi detectado principalmente no Rio das Velhas. As concentrações detectadas variaram de 1,5 a 36,8 ng.L⁻¹. O EE2 também foi detectado em 14 das 72 amostras analisadas, principalmente as retiradas no lago artificial Vargem das Flores. As concentrações variaram de 3 a 54 ng.L⁻¹. Em outro estudo, Moreira et al. (2011) detectaram novamente a presença desses compostos na água bruta no Rio das Velhas onde os mesmos, foram encontrados ocasionalmente. O EE2 foi encontrado em oito amostras em concentrações de 5,6 a 63,8 ng.L⁻¹. E o E2 foi detectado em apenas uma amostra, na concentração de 62,6 ng.L⁻¹.

Concentrações mais altas de E2 e EE2 foram verificadas no estudo realizado por Sodré et al. (2007) no Rio Atibaia e no ribeirão Anhumas na região metropolitana de Campinas. As concentrações de EE2 variaram de 6 a 310 ng.L⁻¹, enquanto o E2 variou de 38 ng.L⁻¹ a 2.510 ng.L⁻¹, no período de estiagem. Em outro estudo na bacia do Atibaia as concentrações de E2 variaram de 6,806 a 106 ng.L⁻¹ (MONTAGNER; JARDIM, 2011), enquanto E2, EE2 e E1 foram detectados por Sodré et al. (2010) em concentrações de 73 ng.L⁻¹, 25 ng.L⁻¹ e 39 ng.L⁻¹, respectivamente.

E2 e E1 foram detectados em mostras do Rio Ebro (Espanha) em concentrações máximas de 1,9 ng.L⁻¹ e 4,9 ng.L⁻¹, respectivamente. Entretanto, a concentração de E1 chegou a 39 ng.L⁻¹ no efluente despejado nesse rio (GORGA; PETROVIC; BARCELÓ, 2013). Esteban et al. (2014) detectaram E1 em concentrações de até 17 ng.L⁻¹ em águas superficiais no Rio Manzanares na Espanha.

Na França, na região de Rhône-Alpes EE2 e E2 foram encontrados em apenas algumas amostras variando de 0,5 a 2,6 ng.L⁻¹ e 0,03 a 1,3 ng.L⁻¹, respectivamente. Por outro lado, E1 foi detectado em 20% das águas em concentrações geralmente na faixa de 0,1 a 1 ng.L⁻¹ (VULLIET; CREN-OLIVÉ, 2011), enquanto Kolpin et al. (2002) reportaram concentração de até 112 ng.L⁻¹ em rios nos EUA, valores inferiores aos registrados nesse trabalho.

Silva; Silva; Silva (2012) na avaliação da qualidade dos efluentes gerados por ETEs na região metropolitana de Recife detectaram a ocorrência de alguns contaminantes emergentes. Dentre eles, o EE2 foi encontrado em concentrações altas (37,5 µg.L⁻¹) na saída da ETE de Cabanga, a qual utilizou apenas processo de tratamento primário. Da mesma forma encontraram na saída da ETE de Jardim Paulista, que utiliza o processo de lagoa aerada, 39,18 µg.L⁻¹ de EE2, mostrando a baixa eficiência desses tipos de tratamentos para remoção de compostos emergentes.

E2 foi detectado em 3,23 e 2,91 ng.L⁻¹ em efluentes tratado por sistemas do tipo lodo ativado convencional em fluxo contínuo e aeração prolongada na Ilha do Governador e Penha no Rio de Janeiro, respectivamente (FERREIRA, 2013). A jusante de Darvill Waste Water Works, principal ETE de Pietermaritzburg na África do Sul, Manickum; Jhon (2014) detectaram concentrações médias EE2 e E1 2 ng.L⁻¹ e 8 ng.L⁻¹, respectivamente, valores esses bem abaixo dos reportados para o ponto no município de Aparecida. Os autores reportaram ainda que em dois rios do Canadá, E1 e EE2 estavam presentes na faixa de 15,8 - 94,1 ng.L⁻¹ e 1,4-18,2 ng.L⁻¹ para o EE2, em efluentes finais de uma ETE. As menores concentrações reportadas para E2, EE2 e E1 nestas publicações comparadas aos valores obtidos no ponto de captação de água no município de Aparecida, mostram a baixa infraestrutura em saneamento básico na região do médio Paraíba do Sul.

Em todos os trabalhos reportados acima, incluindo o presente estudo, a E1 foi determinada sempre em maior frequência e concentração do que o E2 e o EE2. Embora a E1 possua metade da potência estrogênica do E2, esses resultados mostram que a E1 é seguramente um DE importante no meio aquático.

Devido à sua elevada potência estrogênica, o hormônio natural E2 e o estrogênio sintético EE2 são os mais monitorados no meio ambiente. No entanto, como mostrado ambos são detectados em menores concentrações do que a E1. O que pode justificar a

maior presença de E1 nas águas superficiais é o fato de que esse estrógeno além de ser produzido e excretado por seres humanos e outros animais, é um subproduto de degradação de E2 (ESTEBAN et al., 2014).

Kumar et al. (2012) estudaram a biodegradação dos estrogênios conjugados estrona-3-sulfato (E1-3S), estradiol-3-sulfato (E2-3S), estrona-3-glucoronídeo (E1-3G) e estradiol-3-glucoronídeo (E2-3G) em diferentes microcosmos. Os resultados mostraram que E2-3G e E1-3G foram totalmente hidrolisados (desconjugados) quando incubados em esgoto bruto, o qual simula o destino dos conjugados antes de chegarem a uma ETE. Porém, a conversão estequiométrica para os estrógenos livres foi de 60 e 40%, respectivamente. Isso mostra que os conjugados glucoronídeos não necessariamente se convertem para o estrógeno livre. O que se observou no caso do E2-3G, foi que após a conversão em E2 o mesmo se converteu a E1. Isso reforça que a transformação de E2 a E1 ocorre durante o transporte de esgoto, até a ETE. Por outro lado, a incubação de E1-3G em água de rio, produziu uma mistura E1-3G/E1 na proporção de 1:1, enquanto na incubação de E2-3G, foi observada a formação de uma mistura de E2 e E1.

Nesse trabalho, as concentrações determinadas para os DEs estudados, se mostram em sua grande maioria mais elevadas que estudos realizados em países mais desenvolvidos (BENOTTI et al., 2009; KUSTER et al., 2008; PELAYO et al., 2011; VULLIET; CREN-OLIVÉ, 2011). Isso vem reforçar a precariedade do saneamento básico do Brasil. Muito do esgoto aqui gerado não recebe tratamento adequado, impactando de forma negativa o ambiente aquático e ainda, podendo aumentar de forma significativamente a concentração de micropoluentes, dentre eles os DEs, em águas superficiais.

Como sabido, esses compostos podem afetar a biota aquática causando várias efeitos deletérios (AL-ANSARI, et al., 2010). Podem ainda ser transferidos das águas superficiais contaminadas para a água potável produzida para abastecimento público, tornando vulnerável a saúde da população exposta. Vários estudos mostram que os tratamentos convencionais utilizados pelas ETAs não são capazes de remover com eficiência esses compostos (TOURAUD et al., 2011). No caso da cidade de Aparecida, esse fato se torna ainda mais grave, pois como já dito, o ponto de captação de água para abastecimento está a jusante do ponto de descarte de efluente sem tratamento. Além disso, o sistema utilizado para obter água potável é do tipo convencional, o qual inclui as etapas de coagulação, sedimentação e filtração, que removem menos de 25% da concentração

desses compostos. A cloração pode reduzir de 20 a 90% dos níveis de concentração, porém depende das características do composto (SODRÉ et al., 2007).

Adicionalmente, as concentrações que são estimadas em águas superficiais não representam a totalidade desses compostos nos rios pois, a maioria desses compostos possuem moderados ou altos valores de $\log k_{ow}$ de modo a massa que não permanece solúvel muitas vezes acaba em complexos orgânicos, ou sorvido em sedimentos. Nos sedimentos esses compostos podem ser absorvidos biologicamente, degradados e transformados em formas mais ou menos móveis. Se móveis, os complexos de DEs podem se mover de volta para a coluna d'água ou para baixo em direção as águas subterrâneas. Se permanecerem imóveis podem se acumular em organismos bentônicos que servem de alimento a peixes maiores que por ventura podem ainda servirem de alimento aos humanos (CAMPBELL et al., 2006).

Assim, os DEs poderiam obter concentrações diferentes em diferentes profundidades, podendo estar mais concentrados em águas mais profundas, visto a formação de complexos com a matéria orgânica por exemplo.

5.3. Trabalhos Relacionados

O estudo sobre a ocorrência de Desreguladores Endócrinos na Bacia do Rio Paraíba do Sul ainda é escasso. Nesse contexto é de extrema importância avaliá-la. A região possui um grande aglomerado populacional como também, industrial que gera grandes quantidades de esgoto que são lançados no Rio Paraíba diariamente, afetando não só sua biota como também, a população que utiliza o rio para geração de água potável.

Dias et al. (2015) avaliaram a atividade estrogênica no Rio Paraíba do Sul utilizando o ensaio *yeast estrogen screen* (YES). O estudo foi realizado no Rio de Janeiro nas cidades de Resende, Barra Mansa, Volta Redonda e Campo de Goytacazes. Os resultados mostraram atividade estrogênica em todas as amostras acima de 1 ng.L^{-1} equivalente a atividade padrão de E2. Em alguma das campanhas cujas as amostras foram filtradas com filtro de $1,2 \text{ }\mu\text{m}$ o valor chegou a 16 ng.L^{-1} . Por outro lado, quando as mesmas amostras foram filtradas em filtros de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (menor diâmetro de poro) a

atividade estrogênica diminuiu. A partir desses resultados pode-se inferir que parte dos DEs podem ser sorvidos em partículas e sedimentos.

Kuster et al. (2009), analisaram amostras de água de rio no Estado do Rio de Janeiro. Avaliaram a presença de dezenove DEs de diferentes classes: 5 estrógenos livres, 6 estrógenos conjugados, 3 progestágenos e 5 fitoestrógenos em vinte amostras de água, coletadas nos Rios Paraíba do Sul, Guandú e Macaé, no Canal Pavuna e de duas lagoas situadas na parte sul da cidade do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que os estrógenos estavam presentes em concentrações de até $7,3 \text{ ng L}^{-1}$, os progestágenos até $47,1 \text{ ng L}^{-1}$ e os fitoestrogênios chegaram a concentrações de até 366 ng L^{-1} . No Rio Paraíba, os compostos detectados foram progesterona, estriol, estriol-3-glucoronídeo e Genisteína.

Otomo et al. (2010) realizaram um estudo sobre a ocorrência de DEs no Rio Paraíba do Sul nas cidades de Pindamonhangaba, Taubaté, São José dos Campos e Guararema, a partir de coletas de um litro de água bruta. O analito E2 foi o mais detectado chegando a concentração de $1,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, o E1 foi detectado em uma concentração de $0,56 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. Já o EE2 foi detectado em concentrações abaixo de $0,56 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$.

Os trabalhos relacionado acima, corroboram que os resultados encontrados na cidade de Aparecida, não é um caso isolado, mostrando que os rios que cortam as cidades brasileiras com alto índice populacional e forte desenvolvimento industrial estão derradeiramente contaminados por micropoluentes.

5.4. Caracterização das amostras e do ambiente no entorno do ponto de coleta

Com o intuito de estabelecer uma possível relação entre as concentrações dos DEs e as características químicas das amostras coletadas, bem como, as características do ambiente no entorno do ponto de coleta, foi feita a determinação do pH, condutividade, turbidez e temperatura das amostras coletadas. Paralelamente foram levantados dados sobre radiação ultra violeta, índice pluviométrico e número de turistas presentes na cidade de Aparecida, durante o período de estudo. Esses dados foram utilizados na análise estatística que será apresentada no item 5.5.

A variação do pH da água das amostras coletadas nas três profundidades é mostrada na Figura 28.

Figura 28: Valores de pH das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.**

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com a Conama 357/05 os valores de pH permitidos para rio classe 2, como no caso do Rio Paraíba do Sul é de 6,0 a 9,0. Os valores de pH observados mantiveram-se entre 5,9 e 6,8, ao longo do período estudado. Apenas nos dias 04/maio e 06/jul o pH (5,9) ficou fora do estabelecido pela resolução, porém muito próximos do limite inferior preconizado.

A Figura 29 mostra os valores de condutividade da água obtidos nas diferentes coletas realizadas.

A condutividade é a expressão numérica da capacidade da água conduzir corrente elétrica. Este parâmetro depende da concentração iônica e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. A Resolução CONAMA 357/05 não estabelece limites para este parâmetro, porém, níveis superiores a $100 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ podem indicar ambientes impactados (CETESB, 2009).

Figura 29: Valores de condutividade das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.**

Fonte: Arquivo pessoal.

Como observado, todos os valores ficaram acima de $100 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, que podem ser reflexo da alta carga de poluição no ponto de coleta.

A Figura 30 mostra a variação de temperatura da água entre os meses de abril e julho de 2015.

Figura 30: Valores de temperatura das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.**

Fonte: Arquivo pessoal.

A CONAMA 357/05 nada diz a respeito sobre os valores permitidos de temperatura para águas superficiais.

De acordo com os dados se observa que a temperatura foi decrescendo de abril a julho, o que era de se esperar devido a estação de inverno. As temperaturas variaram de $25,9^{\circ}\text{C}$ no dia 27 de abril a $18,2^{\circ}\text{C}$ no dia 06 de julho.

A temperatura, assim como outros fatores, pode influenciar a taxa de remoção de compostos em águas superficiais, devido a influência sobre a atividade de microrganismos presentes na água. Além disso, para muitos compostos de sorção aumenta com a diminuição da temperatura, enquanto a biodegradação é menos eficaz quando a temperatura diminui (VIENO, 2005).

A Figura 31 apresenta os valores de turbidez da água obtidos nas diferentes coletas.

De acordo com a Conama 357/05 os valores de turbidez permitidos para rio classe 2 é de até $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Figura 31: Valores de turbidez das amostras coletadas nas diferentes profundidades. Legenda: 1*= amostra de água superficial; 2= amostra coletada a 0,60 m de profundidade; 3***= amostra coletada a 1,20 m de profundidade.**

Fonte: Arquivo pessoal.

Como observado, várias medições ficaram acima do permitido. Isso pode ser reflexo das constantes cargas poluidoras recebidas diariamente pelo Rio Paraíba do Sul, seja de efluentes sanitários, industriais ou cargas difusas de outras fontes.

Os valores médios de precipitação pluviométrica de Aparecida, disponíveis no site da Cepagri meteorologia UNICAMP, como também a precipitação pluviométrica acumulada dos meses referentes aos das coletas (CLIMATEMPO), para o período estudado são mostrados na Figura 32.

Figura 32: Precipitação pluviométrica acumulada e a média histórica da cidade de Aparecida referente aos meses que coletas as amostras de água no Rio Paraíba do Sul em 2015.

Fonte: Arquivo pessoal.

O padrão de precipitação da região do Vale do Paraíba sofre um grande efeito orográfico devido à presença da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira que possuem elevadas médias de precipitação variando de 1300 a 2800 mm e 1300 a 2800 mm, respectivamente. Em contraste, a região do Vale do Paraíba possui os menores valores médios de precipitação anual da bacia oscilando entre 1200 e 1300 mm (SOARES et al., 2008).

A média de radiação UV (Climatempo) dos meses em que foram realizadas as coletas é mostrada na Figura 33, cuja importância pode estar relacionada aos processos de fotodegradação dos DEs (VIENO; TUHKANEN; KRONBERG, 2005). A radiação UV pode oxidar o anel fenólico dos compostos promovendo a degradação dos mesmos no ambiente.

Figura 33: Variação do índice de radiação UV médio na cidade de Aparecida nos meses que foram realizadas as coletas no Rio Paraíba do Sul.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 10 apresenta a estimativa do número de visitantes a cada fim de semana da cidade de Aparecida, dos meses que foram realizadas as coletas. Esta estimativa é realizada anualmente pelo Santuário Nacional (A12).

Tabela 10: Estimativa do número de visitantes por fim de semana dos meses de abril, maio, junho e julho de 2015.

Visitantes 04-2015		Visitantes 05-2015		Visitantes 06-2015		Visitantes 07-2015	
Sábado	Domingo	Sábado	Domingo	Sábado	Domingo	Sábado	Domingo
(04-abr)	(05-abr)	(02-maio)	(03-maio)	(06-junho)	(07-junho)	(04-julho)	(05-julho)
50.308	88.535	45.759	95.366	67.159	92.537	56.971	81.169
(11-abr)	(12-abr)	(09-maio)	(10-maio)	(13-junho)	(14-junho)	(11-julho)	(12-julho)
48.672	79.862	58.288	85.926	56.269	112.782	69.198	92.186
(18-abr)	(19-abr)	(16-maio)	(17-maio)	(20-junho)	(21-junho)	(18-julho)	(19-julho)
61.196	95.946	70.680	144.202	53.608	90.260	81.785	119.233
(25-abr)	(26-abr)	(23-maio)	(24-maio)	(27-junho)	(28-junho)	(25-julho)	(26-julho)
73.566	108.679	66.784	110.864	54.387	76.662	77.400	107.153
		(30-maio)	(31-maio)				
		69.505	116.917				

Fonte: Arquivo pessoal.

5.5. Análise Estatística

5.5.1. Coeficientes de Correlação de Spearman e Análise dos Componentes Principais (ACP)

Os coeficientes de Correlação de Spearman com as correlações significativas no nível de 95% de confiança entre todas as variáveis analisadas são mostrados nas Tabelas 11, 14 e 17 enquanto a análise dos os componentes principais relativos aos parâmetros avaliados na água nas três diferentes profundidades são apresentados nas Figura 34, 35 e 36.

Na Correlação de Spearman foram suprimidas das Tabelas todas as correlações não significativas, ou seja, abaixo no nível de 5% ($p < 0,05$), as quais estão demarcadas com o símbolo *.

5.5.1.1. *Análise de Correlação de Spearman e Análise dos Componentes Principais das amostra da água coletada na superfície*

De acordo com a Tabela 11, o pH teve correlação negativa com o BFA ($r = -0,57$) e a chuva uma correlação positiva com o mesmo ($r = 0,54$). A temperatura teve correlação negativa com o EE2 ($r = -0,67$). Já o E1 obteve uma correlação negativa com o pH ($r = -0,58$) e negativa com a temperatura ($r = -0,67$).

Na Figura 34 é mostrado a ACP da água coletada na superfície, baseado numa matriz de correlação onde o eixo 1 explica 35,01% do arranjo da variância e em conjunto com o eixo 2 (52,77%), completando 69,66% com o eixo 3.

Tabela 11: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis das amostras coletadas na superfície, com relações significativas no nível de 5% ($p < 0,05$). BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.

	BFA	E2	EE2	E1	pH	Temp.	Chuva	UV	Visitantes
BFA	*	*	*	*	-0,57	*	0,54	*	*
E2	*	*	*	*	*	*	*	*	*
EE2	*	*	*	0,57	*	-0,67	*	*	*
E1	*	*	0,57	*	-0,58	-0,71	*	*	*
pH	-0,57	*	*	-0,58	*	*	*	*	*
Temp.	*	*	-0,67	-0,71	*	*	*	*	*
Chuva	0,54	*	*	*	*	*	*	*	*
UV	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Visitantes		*	*	*	*	*	*	*	*

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 34: Ordenação com base na Análise dos Componentes Principais (ACP) de correlação das variáveis em água coletada na superfície.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 12 apresenta os autovalores (a. v.) gerados na ACP, relativos aos parâmetros analisados, formando os eixos que se agrupam. Em cada eixo existem parâmetros que são ranqueados conforme a influência individual de cada um para a

formação dos arranjos. Esses conjuntos de eixos são extraídos de uma matriz de semelhança entre as variáveis, que são numericamente iguais aos números de variáveis. O comprimento dos autovalores corresponde à sua importância para a explicação da variação

Tabela 12: Contribuição de cada eixo na explicação do arranjo formado na Análise dos Componentes Principais (ACP) com base numa matriz de correlações, das variáveis analisadas em amostras água coletadas na superfície.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
Auto valores (a. v.)	3,15	1,60	1,13
Porcentagem	35,01	17,76	16,89
Porcentagem acumulada	35,01	52,77	69,66

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 13 expressa numericamente os valores dos autovetores e os agrupam em seus respectivos arranjos.

Tabela 13: Correlação das variáveis analisadas com os componentes principais (eixos) 1, 2 e 3 de uma ACP com base numa matriz de correlações de amostras coletadas na superfície. Em negrito os valores que mais influenciaram a formação dos respectivos arranjos. BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
BFA	0,397	0,731	-0,028
E2	0,308	0,080	-0,133
EE2	0,805	-0,149	0,076
E1	0,842	-0,210	-0,051
pH	-0,737	-0,194	0,521
Temp.	-0,852	0,427	-0,110
Chuva	0,078	0,566	0,722
UV	-0,402	0,139	-0,811
Visitantes	-0,327	-0,656	0,176

Fonte: Arquivo pessoal.

5.5.1.2. Análise de Correlação de Spearman e Análise dos Componentes Principais em amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade

A Tabela 14 mostra a Correlação de Spearman para amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade. A chuva teve uma correlação positiva com o BFA ($r = 0,54$). O número de visitantes teve uma relação negativa com o EE2 ($r = -0,59$), já o E1 teve uma relação negativa com a temperatura ($r = -0,76$).

Tabela 14: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis das amostras coletadas a 0,60 m de profundidade, com relações significativas no nível de 5% ($p < 0,05$). BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.

	BFA	E2	EE2	E1	pH	Temp.	Chuva	UV	Visitantes
BFA	*	*	*	*	*	*	0,54	*	*
E2	*	*	*	*	*	*	*	*	-0,59
EE2	*	*	*	0,59	*	*	*	*	*
E1	*	*	0,59	*	*	-0,76	*	*	*
pH	*	*	*	*	*	0,63	*	*	*
Temp.	*	*	*	-0,76	0,63	*	*	*	*
Chuva	0,54	*	*	*	*	*	*	*	*
UV	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Visitantes	*	*	-0,59	*	*	*	*	*	*

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 35 é mostrado a ACP de amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade, baseado numa matriz de correlação onde o eixo 1 explica 36,24% do arranjo da variância e em conjunto com o eixo 2 (56,08%), completando 72,42% com o eixo 3.

Figura 35: Ordenação com base na Análise dos Componentes Principais (ACP) de correlação das variáveis em amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 15 apresenta os autovalores (a. v.) gerados na ACP relativos aos parâmetros analisados, formando os eixos que se agrupam.

Tabela 15: Contribuição de cada eixo na explicação do arranjo formado na Análise dos Componentes Principais (ACP) com base numa matriz de correlações, das variáveis analisadas em amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
Autovalores	3,26	1,79	1,47
Porcentagem	36,24	19,84	16,34
Porcentagem acumulada	36,24	56,08	72,42

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 16 expressa numericamente os valores dos autovetores e os agrupam em seus respectivos arranjos.

Tabela 16: Correlação das variáveis analisadas com os componentes principais (eixos) 1, 2 e 3 de uma ACP com base numa matriz de correlações. Em negrito os valores que mais influenciaram a formação dos respectivos arranjos das amostras coletadas a 0,60 m de profundidade. BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
BFA	-0,396	-0,618	0,247
E2	0,209	0,603	-0,427
EE2	-0,809	0,186	-0,180
E1	-0,807	-0,291	-0,269
pH	0,766	-0,132	0,130
Temp.	0,837	0,366	-0,230
Chuva	-0,237	0,339	0,828
UV	0,494	0,401	-0,603
Visitantes	0,411	-0,703	0,065

Fonte: Arquivo pessoal.

5.5.1.3. Análise de Correlação de Spearman e Análise dos Componentes Principais em amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade

A Tabela 17 mostra a correlação de Spearman para amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade. De acordo com a Tabela o E1 teve uma correlação negativa com a temperatura ($r = -0,64$).

Na Figura 36 é mostrado a ACP das amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade, baseado numa matriz de correlação onde o eixo 1 explicou 34,31% do arranjo da variância e em conjunto com o eixo 2 52,34%, completando 68,76% com o eixo 3.

Tabela 17: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis das amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade, com relações significativas no nível de 5% ($p < 0,05$). Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.

	BFA	E2	EE2	E1	pH	Temp.	Chuva	UV	Visitantes
BFA	*	*	*	*	*	*	0,54	*	*
E2	*	*	0,55	*	*	*	*	*	*
EE2	*	0,55	*	*	*	*	*	*	*
E1	*	*	*	*	*	-0,64	*	*	*
pH	*	*	*	*	*	*	*	*	0,48
Temp.	*	*	*	-0,64	*	*	*	0,49	*
Chuva	*	*	*	*	*	*	*	*	*
UV	*	*	*	*	*	0,49	*	*	*
Visitantes	*	*	*	*	0,48	*	*	*	*

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 36: Ordenação com base na Análise dos Componentes Principais (ACP) de correlação das variáveis em amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 18 apresenta os autovalores (a. v.) gerados na ACP relativos aos parâmetros analisados, formando os eixos que se agrupam.

A Tabela 19 expressa numericamente os valores dos autovetores e os agrupam em seus respectivos arranjos.

Tabela 18: Contribuição de cada eixo na explicação do arranjo formado na Análise dos Componentes Principais (ACP) com base numa matriz de correlações, das variáveis analisadas em amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
Autovalores	3,09	1,62	1,48
Porcentagem	34,31	18,03	16,42
Porcentagem acumulada	34,31	52,34	68,76

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 19: Correlação das variáveis analisadas com os componentes principais (eixos) 1, 2 e 3 de uma ACP com base numa matriz de correlações das amostras coletadas a 1,20 m de profundidade. Em negrito os valores que mais influenciaram a formação dos respectivos arranjos. BFA= Bisfenol-A; E2= β -estradiol; EE2= 17 α -etinilestradiol; E1= estrona; pH= potencial hidrogênico; Temp.= Temperatura da água e UV= radiação ultra violeta.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
BFA	0,262	0,526	-0,025
E2	0,677	0,159	-0,004
EE2	0,838	-0,135	-0,152
E1	0,731	-0,217	0,416
pH	-0,685	-0,438	0,038
Temp.	-0,800	0,313	-0,171
Chuva	-0,050	-0,268	-0,863
UV	-0,313	0,745	0,369
Visitantes	-0,339	-0,582	0,607

Fonte: Arquivo pessoal.

A variação das concentrações dos micropoluentes podem sofrer variância devido a mudanças sazonais. Este é particularmente o caso de compostos farmacêuticos e DEs. As alterações na temperatura, a taxa de precipitação e radiação solar podem influenciar a quantidade de moléculas encontradas tanto em águas residuais como em águas superficiais. Mesmo que os mecanismos de eliminação de compostos farmacêuticos não sejam exatamente conhecidos, sabe-se que a biodegradação e sorção são os principais processos de eliminação, sendo dependentes da temperatura. A fotodegradação é um processo de eliminação que é menos eficaz durante o inverno, quando a radiação solar é mínima (DEBLONDE, 2011).

Variações sazonais podem influenciar também a concentração micropoluentes na entrada do esgoto bruto em ETEs (KOLPIN et al., 2004).

Kasprzyk-Hordern; Dinsdale; Guwy (2009) verificaram que as concentrações da maioria dos fármacos e produtos de higiene pessoal no esgoto bruto foi duplicado quando o

fluxo foi reduzido pela metade durante o período seca, sugerindo que a água da chuva pode diluir as concentrações dos compostos dentro no esgoto.

Os micropoluentes sofrem interação em diferentes graus com o ambiente, como por exemplo, diluição, eventual adsorção em sólidos e sedimentos suspensos, fotólise direta e indireta e biodegradação aeróbica e anaeróbica (PAL et al., 2010).

Writer et al. (2012) avaliaram o destino e o transporte de alguns DEs (4-nonilfenol, 17 β -estradiol e estrona) ao longo do Rio Redwood a sudoeste de Minnesota. O brometo foi usado para rastrear a mesma amostra de água a jusante da ETE de Marshall. Os autores citaram que a fotólise, sorção, biodegradação e volatilização são os principais responsáveis pelo decaimento das substâncias ao longo do rio.

De acordo com o Coeficiente de Correlação de Spearman, nas amostras coletadas na superfície, o índice pluviométrico correlacionou-se positivamente com a concentração de BFA. Isto é mostrado na Tabela 11. A ACP (Figura 33) indicou a formação de um eixo específico para os vetores chuva e BFA, com correlação positiva no eixo 2 e auto valores (a. v.) de 0,566 e 0,731 (Tabela 13), respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos para amostras de água coletadas a 0,60 m de profundidade (Tabela 14). A ACP apontou a formação de um eixo específico entre os vetores chuva e BFA com correlação positiva (a. v. -0,237 e -0,396) (Tabela 16). Já nas amostras coletadas em 1,20 m de profundidade não foi observado correlação em nenhuma das análises.

Sabe-se que a chuva pode tanto aumentar a concentração de DEs no meio aquático através da lixiviação de campos agrícolas, industriais e fazendas que criam gado e outros animais, como também diminuir essa concentração devido ao fato da mesma proporcionar uma diluição de compostos em geral nos corpos d'água, na ausência da premissa anterior.

Em um estudo realizado no Rio Chaobai, em Pequim, o BFA foi um dos analitos mais detectados e sua concentração na estação da seca foi maior do que aquelas encontradas na estação da chuva. Essa confirmação foi atribuída à baixa precipitação pluviométrica. Em média, as concentrações de DEs na estação seca foram 30% maiores do que aqueles na estação chuvosa devido a menor diluição dos analitos no rio (LI et al., 2013). Resultados semelhantes foram publicados por Loiraine; Pettigrove (2006) em águas superficiais tratadas analisadas no Estados Unidos. O efeito de diluição também foi

divulgado por Wang et al. (2011) para produtos farmacêuticos em amostras de água, quando comparadas os resultados obtidos na estação do inverno e verão.

Resultados opostos também foram relatados em outros trabalhos (JUNGNICKEL et al., 2008; SAKAMOTO; SHOJI; KANEKO, 2007; SCHOKNECHT et al., 2009; SINGER et al., 2010). Alguns estudos revelaram que os produtos químicos, como BFA, biocidas utilizados em material de construção, pavimentação, fachadas e pinturas de telhados foram lixiviados pelas chuvas e posteriormente, incorporados às águas superficiais. Além disso, em caso de enchentes pode ocorrer o transbordamento de esgoto, causando maior impacto ambiental pela ação desses contaminantes (LUO et al., 2014).

Manickum; Jhon (2014) descreveram que a concentração de DEs foi maior em efluentes analisados durante a primavera (início das chuvas) do que no inverno (estiagem), o que era esperado. Por outro lado, observaram também, que as menores concentrações foram registradas no inverno e não no verão, como se esperava. Excluindo-se os dados do verão, houve um aumento nas concentrações dos hormônios com o aumento da pluviosidade, o que foi atribuído ao escoamento da chuva. Todavia, os autores não encontraram uma correlação linear significativa entre os padrões de chuvas sazonais baixas e altas com níveis médios individuais ou totais destes hormônios.

No estudo de Sodré et al. (2007) a presença de BFA foi determinada em águas superficiais e as concentrações mais elevadas foram notadas o período de estiagem. No entanto, os autores também detectaram a presença de di-n-butilftalato em maiores concentrações no período mais chuvoso. Segundo os autores, a presença desse último composto foi explicado pela lixiviação decorrentes da decomposição de materiais plásticos descartados no lixo e esgoto, bem como, pelo lançamento de efluentes industriais.

Concentrações medidas de DEs, entre eles o BFA, em efluentes de águas residuais municipais e no Rio Glatt, Suíça, mostraram que o transbordamento de esgoto durante fortes chuvas provocaram a descarga de águas residuais não tratadas nos rios agravando o impacto desses contaminantes sobre a biota fluvial. O volume de água na área de estudo variou consideravelmente durante o período de amostragem. A concentração da maioria dos compostos aumentou com o volume de água, mostrando predomínio do acúmulo dessas substâncias em lugar da diluição (GIGER et al., 2009).

A correlação positiva da chuva com o BFA na cidade de Aparecida, pode estar ligada a lixiviação de derivados de plásticos despejados nos efluentes produzidos pelas inúmeras microempresas produtoras souvenir instaladas no município.

De acordo com o Coeficiente de Correlação de Spearman, nas amostras coletadas na superfície, a variação de pH foi inversamente proporcional a concentração de BFA. Isto é mostrado na Tabela 11. Porém, na ACP não foi visualizada esta correlação (Tabela 13).

Não existe na literatura muitos estudos que correlacionam a variação do pH com concentrações de DEs em águas superficiais. O destino desses compostos no ambiente depende na maioria das vezes das propriedades físicas e químicas das substâncias, bem como das propriedades do corpo receptor. O pH pode influenciar a adsorção desses compostos com sólidos suspensos e no sedimento e consequentemente na disponibilidade dos mesmos na água.

A sorção é influenciada pela carga superficial do sorvente e pelo grau de ionização da substância, que por sua vez, são influenciadas pelo pH. Assim, o pH do ambiente aquoso determina a carga superficial do sorvente e a dissociação ou protonação do composto.

Devido a sua lipofilicidade e baixa volatilidade, o processo de sorção em sedimentos e material suspensos pode ser um fator significativo na redução de DEs na fase aquosa.

A sorção de micropoluentes em um sólido depende em grande parte da hidrofobicidade do composto. O K_{ow} é freqüentemente usado para prever a absorção de micropoluentes em sólidos. Rogers (1996) formulou uma regra geral de aplicação do K_{ow} para a estimativa da sorção: $\text{Log}K_{ow} < 2,5$ indica baixo potencial; valores entre $2,5 < \text{Log}K_{ow} < 4$ potencial médio; e $\text{Log}K_{ow} > 4$ elevado potencial. Ainda, a acidez provocada por um grupo funcional do composto pode desempenhar um papel importante na quimissorção e/ou adsorção eletrostática de micropoluentes. Quando pH está acima da constante de dissociação de ácido (pKa), o grupo hidroxila fenólico de hormônios se dissocia e os compostos tornam-se carregados negativamente, facilitando a repulsão de cargas (SCHÄFER; AKANYETI; SEMIÃO, 2011).

Segundo Bautista-Toledo et al. (2005), o BFA é encontrado na forma neutra em pHs < 8. Acima desse valor sofre desprotonação para formar o mono-ânion bisfenolato.

Com o aumento do pH o caráter hidrofóbico do BFA tendem a diminuir, o que ocasionaria uma maior disponibilidade do analito na água. Porém, ao contrário do esperado o BFA se correlacionou negativamente com o pH. O mesmo foi observado com E1 e EE2 em amostras coletadas na superfície e 0,60 m de profundidade, como mostrado pelo Coeficiente de Correlação de Spearman (Tabelas 11 e 14). Por outro lado, não foi constatada nenhuma correlação para as amostras coletadas a 1,20 m de profundidade (Tabela 17). A ACP mostrou correlação negativa entre o pH e a E1 e o EE2 em amostras de águas coletadas na superfície e a 0,60 m (Tabela 13 e Tabela 16). Os auto valores do pH com E1 e EE2 em águas de superfície foi de -0,737 e 0,842 e de -0,737 e 0,808, respectivamente. Em amostra de água coletadas a 0,60 m os a.v. do pH com E1 e EE2 foram de 0,766 e -0,807 e 0,766 e -0,809, respectivamente. Esses resultados poderiam ser explicados pela alta carga de matéria orgânica dissolvida presente no rio, pelo efluente despejado a jusante do ponto de coleta, que poderia diminuir a sorção desses compostos neutros e hidrofóbicos, no sedimento e sólidos em suspensão.

Su-Hua; Bing-Zhi; Yu (2010) estudaram a remoção de BFA em um sistema de filtração com membrana de polissulfona. Concluíram que quanto maior o teor de matéria orgânica no meio, menor a adsorção do BFA e concluíram que isso se deve a competição de ambos pelos sítios de ligação da membrana. Outros estudos sobre a remoção de DEs também chegaram as mesmas conclusões. Hu; Jin; Ong (2007) avaliaram a interferência da matéria orgânica na remoção de E1. A presença da mesma fez com que a adsorção da E1 pela membrana diminuísse através da competição pelos sítios de ligação. Da mesma forma, em ambientes naturais a matéria orgânica pode competir por sítios de ligação em sedimentos, com outros compostos incluindo os DEs.

Levando em consideração o caráter hidrofóbico dessas substâncias, presume-se que os DEs tenham uma maior afinidade pela sorção com a matéria orgânica, principalmente a dissolvida. Sabe-se que a matéria orgânica dissolvida é a forma mais abundante de matéria orgânica encontrada em ambientes aquáticos, representando a fração que pode transpor a barreira física de filtros com porosidade definida operacionalmente. A porosidade do filtro tipicamente encontrada na literatura é 0,45 μm (BAUMGARTEN; WALLNER-KERSANACH; NIENCHESKI, 2010).

Andrade et al. (2010), a partir de um estudo realizado no Rio Paraíba do Sul no trecho de Taubaté, relacionaram a concentração de matéria orgânica com a redução do pH. A decomposição da matéria orgânica libera dióxido de carbono (CO_2) o que torna a água mais ácida. Assim, quanto maior a concentração de matéria orgânica menor o pH. É amplamente reconhecido que a sorção de compostos orgânicos hidrofóbicos em matéria orgânica dissolvida natural, pode aumentar significativamente a sua solubilidade e disponibilidade em água, afetando o destino destas espécies químicas no ambiente aquoso (YAMAMOTO et al., 2003). Esses autores estudaram a correlação do coeficiente de sorção ($\log K_{oc}$) de alguns DEs (17 α -estradiol, estriol, 17 α -etinilestradiol, nonilfenol, butilfenol, e dibutil ftalato) com o coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), com diferentes tipos de matéria orgânica. Verificaram, que os coeficientes de sorção eram independentes dos coeficientes de partição octanol-água. Este fato indicou que a interação hidrofóbica não era o mecanismo predominante e que outros mecanismos de sorção deveriam ter um papel mais importante na sorção dos DEs pela matéria orgânica.

Assim, essas conclusões podem explicar a correlação negativa observada entre o pH e as concentrações de BFA, EE2 e E1, visto a alta concentração de matéria orgânica no ponto de coleta resultante do descarte de efluente. A matéria orgânica é a responsável por aumentar a disponibilidade desses compostos na água como também a diminuição do pH.

De acordo com o Coeficiente de Correlação de Spearman, a temperatura correlacionou-se negativamente com E1 em todas as amostras de água das diferentes profundidades (Tabelas 11, 14 e 17). A mesma correlação também foi observada com EE2 em amostras de água coletadas na superfície (Tabela 11). Na ACP, a correlação negativa entre temperatura e E1 e temperatura e EE2 foi observada da mesma forma para todas as diferentes profundidades (Tabelas 13, 16 e 19). Nas amostras coletadas na superfície os a. v. para a correlação entre temperatura e E1 foram de -0,852 e 0,842, respectivamente e entre a temperatura e EE2 foram de -0,852 e 0,805, respectivamente. Em amostras coletadas a 0,60 m de profundidade os a. v. da temperatura e E1 foram de 0,837 e -0,807, respectivamente e entre a temperatura e EE2 foram de 0,837 e -0,809, respectivamente. Enquanto em amostras de água coletadas a 1,20 m de profundidade os a. v. da correlação entre a temperatura e E1 foram de -0,800 e 0,731, respectivamente e entre a temperatura e EE2 foram de -0,800 e 0,838, respectivamente.

Como já dito, as principais vias de eliminação dos DEs em águas superficiais, são através dos processos de biodegradação, sorção e fotodegradação, que por sua vez estão correlacionados com a temperatura (VIENO; TUHKANEN; KRONBERG, 2005).

A biodisponibilidade desses compostos na água dependem em muito da atividade dos microrganismos e, dessa forma, a temperatura também é um fator importante, uma vez que o crescimento microbiano é determinado por faixas de temperaturas ótimas. Assim, quanto maior a temperatura maior será a biodegradabilidade dos DEs pois maior será a atividade microbiana e menor a concentração das substâncias na água. No entanto, em temperaturas mais elevadas o processo de sorção, que é exotérmico, é desfavorecido e o composto apresentará uma maior solubilidade no meio aquoso, favorecendo ainda mais sua biodisponibilidade (AQUINO; BRANDIT; CHERNICHARO, 2013).

Vieno, Tuhkanen e Kronberg (2005) estudaram o destino de alguns fármacos no Rio Aura na Finlândia a partir do efluente de uma ETE. Eles chegaram a conclusão de que a principal razão para o maior nível de contaminação na água do rio, durante a estação de inverno, era devido a maior concentração de micropoluentes no efluente das ETEs, visto a baixa biodegradabilidade desses compostos nas ETEs. Este fato foi atribuído a menor atividade microbiana em temperaturas mais baixas. Da mesma forma, no rio esse efeito também foi observado, tanto pela baixa atividade microbiana, como pelo menor índice de radiação ultravioleta, o que diminui a fotodegradação dos compostos nas águas superficiais. Portanto, durante a estação de inverno, produtos farmacêuticos podem ser encontrados em águas naturais em concentrações maiores quando comparado com a estação de verão, causadas pelas baixas taxas de eliminação. Li et al. (2013) também chegaram a essa conclusão, no estudo realizado ao longo do Rio Chaobai em Pequim, atribuídos as baixas temperaturas e menores precipitações pluviométricas.

A taxa máxima de crescimento dos microrganismos depende intimamente da temperatura. Clara et al. (2005) afirmaram que em uma ETE, por exemplo, cada aumento da temperatura em 10°C leva a uma duplicação da atividade microbiana, até uma certa temperatura.

A influência da variação sazonal na remoção de substâncias também foram analisadas nas ETEs. Yu; Wu; Chang (2013) concluíram que a concentração de DEs e outros compostos no efluente, foi maior no inverno que na estação do verão com variação

bastante significativa. Eles atribuíram isso ao maior consumo de fármacos pela população durante o período de inverno, como também pela maior eficiência na degradação desses compostos nas ETEs no período de verão .

Nie et al. (2012) investigaram o destino e a variação sazonal de vários produtos químicos de desregulação endócrina, incluindo E1, E2, EE2 e BFA em uma estação de tratamento de esgoto municipal localizado em Pequim, China, monitorando suas concentrações ao longo das quatro estações do ano. As concentrações no efluente de E1 e E2 na estação de inverno foi significativamente maior do que suas concentrações no verão. As variações sazonais nas concentrações de BFA no efluente exibiu uma tendência muito similar. Sua eficiência de remoção variou de 44% no inverno e 99% no verão. A remoção dos DEs mostrou dependência sazonal significativa devido a maior biodegradabilidade desses compostos no verão.

Qiang et al. (2013) também investigaram a influência da temperatura na remoção de DEs em ETEs localizadas na província de Zhejiang, na China. Em geral, houve uma remoção superior de E1, EE2 e BPA no verão (> 70%) do que no inverno. Os autores ainda avaliaram o impacto do efluente descarregado a partir de uma ETE, sobre a qualidade da água de um rio local. Na temporada de verão, a concentração total de DEs a montante da ETE foi de 65 ng L⁻¹. Essa concentração aumentou rapidamente para 151,4 ng L⁻¹ na secção de mistura (saída do efluente), e em seguida caiu para 94,9 ng L⁻¹ 1 km a jusante do descarte. A concentração total de DEs mostraram uma tendência semelhante de variação no inverno, mas com um valor mais alto em cada seção, provavelmente devido à atividade microbiana inibida pela baixa temperatura. A concentração total dos DEs chegou a 336,1 ng L⁻¹ na secção de mistura, que foi cerca de duas vezes maior do que no verão.

Uma vez em águas de superfície, os micropoluentes podem sofrer reações de transformação abiótica. A fotodegradação pode desempenhar um papel importante na superfície da água para a degradação de alguns compostos fenólicos, por exemplo (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Há vários indícios de que a degradação fotoquímica pode ser um fator para a determinação do destino ambiental de micropoluentes. Muitos destes compostos apresentam anéis aromáticos, heteroátomos, e outros grupos funcionais que podem absorver radiação solar. Além disso, alguns destes compostos também possuem porções

estruturais, tais como fenol, que são semelhantes aos encontrados em pesticidas, que sofrem fotodegradação (BOREEN; ARNOLD; MCNEILL, 2003).

Andreozzi; Raffaele; Nicklas (2003) investigaram a fotodegradação de alguns produtos farmacêuticos encontrados em ETEs de países europeus através da análise dos tempos de meia-vida em diferentes épocas e latitudes. Os resultados demonstram que o $t_{1/2}$ da carbamazepina e ácido clofíbrico foi de aproximadamente 100 dias no inverno em latitudes mais altas (50 °N). Nas mesmas condições sulfametoxazol, diclofenaco, ofloxacino e propranolol foram degradados mais rapidamente, com $t_{1/2}$ de 2,4; 5,0; 10,6 e 16,8 dias, respectivamente. Contudo, essa correlação não foi observada nesse trabalho (Tabelas 11, 13, 14, 16, 17 e 19). Porém, como as coletas foram realizadas em uma única época do ano (outono), a variação de radiação não pode ser mensurada. Além disso, este é um processo de eliminação que é bem menos eficaz nos meses de outono e inverno, uma vez que, a radiação solar é mínima nesse período. Nesse sentido, outros estudos serão necessários para avaliar a influência dessa variável sobre a degradação desses compostos nas águas do Rio Paraíba do Sul.

Curiosamente, o número de visitantes obteve uma pequena correlação negativa com EE2 em amostra de água coletadas a 0,60 m, como mostrado pelo Coeficiente de Correlação de Spearman (Tabela 14). Sabe-se que o EE2 é um hormônio sintético utilizado exaustivamente em pílulas anticoncepcionais e sua ocorrência no ambiente, como já dito, se dá principalmente pela excreção humana que chega ao ambiente via esgoto doméstico. A correlação negativa poderia então ser explicada por dados subestimados do número de visitantes, visto que, a secretaria do turismo da cidade de Aparecida utiliza dados fornecidos pela Basílica, cuja a estimativa é feita anualmente. A probabilidade de erro na estimativa da população flutuante pode ser apoiada nos dados obtidos na coleta do dia 13 de abril (Tabela 10), que precedeu o fim de semana comemorativo da festa de São Benedito. Como esperado, nessa coleta foram detectados maiores concentrações de E2. Resultados semelhantes foram observados nos meses de junho e julho, com a ocorrência da festa de São João e a romaria do Apostolado da Oração que precederam a coleta do dia 15 de junho e na coleta do dia 22 que precedeu as romarias da Diocese de Limeira e Irmandade do Santíssimo no mês festivo de São João, na coleta do dia 06 de julho após a romaria da Campanha dos Devotos e na coleta do dia 27 de julho após romaria da Diocese de Nova Hamburgo (ver concentrações dos DEs nessas datas na Tabela 9).

6 Conclusões

O método desenvolvido para a análise de BFA, E2, EE2 e E1, se mostrou adequado. As concentrações encontradas na cidade de Aparecida foram altas, o que não representou uma exceção à regra.

A água coletada na cidade de Aparecida para abastecimento público contém alto teor de matéria orgânica e altas concentrações de DEs. Como o sistema de tratamento de Aparecida é do tipo convencional, os DEs provavelmente não estão sendo eficientemente removidos, o que expõe a população a esses compostos.

A análise estatística dos resultados mostrou que somente parte das variáveis estudadas apresentou correlação. Foram estabelecidas correlações entre índice pluviométrico e BFA, temperatura e concentrações de E1 e EE2, pH e concentrações de BFA, E1 e EE2 e número de visitantes com EE2. As demais variáveis não apresentaram nenhuma correlação.

A entrada de DEs no ambiente pode causar efeitos nocivos em organismos expostos, mesmo em baixas concentrações, podendo levar espécies à extinção ou causar desequilíbrio das populações aquáticas e em última instância chegar ao homem, visto a intrincada teia da cadeia trófica.

A exposição de seres humanos aos DEs pode estar associada a várias doenças crônicas, como por exemplo o aumento do número de cânceres no sistema reprodutivo.

Em contraste aos países desenvolvidos, no Brasil ainda não existe nenhuma lei regulamentadora para as questões do descarte desses micropoluentes em ETEs, nem para a comercialização de substâncias descritas como DEs. O saneamento básico ainda é muito precário. Enorme parte do esgoto produzido é lançado *in natura* em corpos receptores. Se for levado em conta que as águas superficiais contaminadas são utilizadas para a produção de água potável, o problema torna-se mesmo mais grave.

A remoção dos DEs só se dará através de mais investimentos em saneamento básico, com implementação de sistemas de tratamento mais eficientes, devendo incluir até

mesmo tratamentos terciários e a criação de leis regulamentadoras *para serem cumpridas*, o que é tão necessário ao país.

Referências

- A12. **Santuário Nacional Aparecida**. Disponível em: <http://www.a12.com/santuario-nacional/servicos/estimativa_de_movimento>. Acesso em: 13 ago. 2015.
- Água um olhar integrado**. Disponível em: <http://www.c2o.pro.br/vis_int_agua/x908.html>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- AKIN, L. et al. The endocrine disruptor bisphenol A may play a role in the aetiopathogenesis of polycystic ovary syndrome in adolescent girls. **Acta Paediatrica**, v. 104, n. 4, p. e171–e177, 2015.
- AL-ANSARI, A. M. et al. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17a-ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 8, p. 2566–2571, 2010.
- AL-ODAINI, N. A. et al. The occurrence of human pharmaceuticals in wastewater effluents and surface water of Langat River and its tributaries, Malaysia. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 245–264, 2013.
- ALVES, C. et al. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1005–1014, 2007.
- ANDRADE, M. H. et al. Impactos da produção do arroz inundado na qualidade da água do rio Paraíba do Sul - trecho Taubaté , SP , Brasil Impacts of irrigated rice production on the water quality of the Paraíba do Sul river - Taubaté region , SP , Brazil. **Revista Ambiente e Água**, v. 5, n. 1, p. 114–133, 2010.
- ANDREOZZI, R.; RAFFAELE, M.; NICKLAS, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere**, v. 50, p. 1319–1330, 2003.
- ANVISA, A. N. DE V. S. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- AQUINO, S. F. DE; BRANDIT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupters in sewage treatment plants : literature review Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto : revisão da literatura. **Eng Sanit Ambient**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.
- BALLESTEROS-GÓMEZ, A. et al. Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography – fluorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 3, p. 51–59, 2007.
- BARS, R. et al. Science based guidance for the assessment of endocrine disrupting properties of chemicals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 37–46, 2011.
- BARS, R. et al. Risk assessment of endocrine active chemicals: Identifying chemicals of regulatory concern. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 143–154, 2012.
- BAUMGARTEN, M. G. Z. WALLNER-KERSANACH, M. NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de análises em oceanografia química**. 2. ed. Rio Grande: FURG, 2010.

BAUTISTA-TOLEDO, I. et al. Bisphenol A removal from water by activated carbon. Effects of carbon characteristics and solution chemistry. **Environment Science & Technology**, v. 39, n. 16, p. 6246–6250, 2005.

BELISÁRIO, M. et al. O emprego de resíduos naturais no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes. **Revista Científica Internacional**, v. 10, p. 1–13, 2009.

BENOTTI, M. J. et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 3, p. 597–603, 2009.

BERGMAN, Å. et al. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. **World Health Organization**, jun. 2013.

BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização**. 300 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; MCNEILL, K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment : a review. v. 65, p. 320–341, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Norma de Qualidade de água para Consumo Humano. Portaria 2914. Dezembro de 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 2010. (Nota técnica).

BRIAN, J. V. et al. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 721–728, 2005.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BRITO, N. N. ; SILVA, V. B. M. Processo oxidativo avançado e sua aplicação ambiental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v. 3, p. 36–47, 2012.

BROSÉUS, R. et al. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. **Water Research**, v. 43, n. 18, p. 4707–4717, 2009.

BROWNE, D. J. et al. CE with a boron-doped diamond electrode for trace detection of endocrine disruptors in water samples. **Electrophoresis**, v. 34, n. 14, p. 2025–2032, 2013.

CAMPBELL, C. G. et al. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1265–1280, 2006.

CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual review of physiology**, v. 73, p. 135–162, 2011.

CEIVAP. COMITÊ DE INTEGRAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO PARAÍBA DO SUL. Disponível em: <<http://www.ceivap.org.br/downloads/mapa2.jpg>>. Acesso em: 3 set. 2014.

CEIVAP. COMITÊ DE INTEGRAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO PARAÍBA DO SUL. Pelas Águas do Paraíba. n. 3, 2009.

CEPAGRI. CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS A AGRICULTURA. Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_028.html>. Acesso em: 12 ago. 2015.

CÉSPEDES, R. et al. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia , NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, p. 1710–1719, 2005.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. Série de relatórios: Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo. p. 43, 2009.

CHANG, H. S. et al. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 1–12, 2009.

CLARA, M. et al. The solids retention time — a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. **Water Research**, v. 39, p. 97–106, 2005.

CLIMATEMPO. **Previsão do Tempo, Aparecida-SP.** Disponível em: <<http://www.climatempo.com.br/previsao-do-tempo/cidade/395/aparecida-sp>>.

CLOUZOT, L. et al. 17a-ethinylestradiol: an endocrine disrupter of great concern. analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. **Environmental Progress**, v. 27, n. 3, p. 383–396, 2008.

COE, T. S. et al. Impacts of early life exposure to estrogen on subsequent breeding behavior and reproductive success in zebrafish. **Environment Science & Technology**, v. 44, n. 16, p. 6481–6487, 2010.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: **FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFIA**. Campinas: UNICAMP, 2006. p. 17–45.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.

COPPETEC, F. Estudo da relação entre floresta/uso do solo e disponibilidade hídrica na Bacia do Rio Paraíba do Sul. Resende, 2003. p114.

COPPETEC, F. **Plano de recursos hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul** - Resumo plano de recursos hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul - Resumo. Resende, 2006. p. 201.

CORREIA, C. C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, p. 1–7, 2015.

COT. COMMITTEE ON TOXICITY. Regulatory definition of endocrine disruptors. 2012. Disponível em: <<http://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/tox201015.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2014.

DAMSTRA, T. Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. **Clinical toxicology**, v. 40, n. 4, p. 457–465, 2002.

DEKANT, W.; COLNOT, T. Endocrine effects of chemicals: aspects of hazard identification and human health risk assessment. **Toxicology Letters**, v. 223, n. 3, p. 280–286, 2013.

DEL-MAZO, J. et al. Endocrine disruptors, gene deregulation and male germ cell tumors. **The International journal of developmental biology**, v. 57, n. 2-4, p. 225–39, 2013.

DHAINI, H. R.; NASSIF, R. M. Exposure assessment of endocrine disruptors in bottled drinking water of Lebanon. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 9, p. 5655–5662, 2014.

DIAS, A. C. V. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 41–47, 2015.

DUSSAULT, È. B. et al. Bioaccumulation of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1635–1641, 2009.

EC. EUROPEAN COMMISSION. REGULATION (EC) No 1107/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. 2009 b, p. 1–50. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:EN:PDF>>. Acesso em: 10 set. 2014.

ECETOC. **Guidance on Identifying Endocrine Disrupting Effects** **Ecotoxicology**. Disponível em: <<http://www.ecetoc.org/technical-reports>>. Acesso em: 11 set. 2014.

ESTEBAN, S. et al. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, v. 466-467, p. 939–951, 2014.

EU. EUROPEAN UNION. Risk Assessment Report. Bisphenol A, CAS No: 80-05-7, Addendum 2008. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission Joint Research Centre, 3rd Priority List, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. Disponível em: <<http://echa.europa.eu/documents/10162/d1d9e186-4385-4595-b6cb-5a1a7a160f07>>. Acesso em: 11 set. 2014.

FENG, L. et al. Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 944–964, 2013.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.

FERNANDEZ, M. A. et al. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica**, v. 18, n. 2, p. 463–476, 2002.

FERREIRA, A. P. Desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgotos: Complicações ao meio ambiente. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 35, n. 2, p. 307–316, 2013.

FERREIRA, F. D.; CORAIOLA, M. Eficiência do loda ativado em fluxo contínuo para tratamento de esgoto. **Revista Acadêmica: Ciência Agrária Ambiental**, v. 6, n. 2, p. 259–279, 2008.

FICK, J. et al. Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 7, p. 2661–2666, 2010.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. New hydrophilic materials for solid-phase extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 394–406, 2005.

FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6–16, 2010.

FROMME, H.; THOMAS, K.; WENZEL, A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment b. **Water Research**, v. 36, p. 1429–1438, 2002.

GIGER, W. et al. Environmental fate of phenolic endocrine disruptors : field and laboratory studies. **Philosophical Transactions of The Royal Society A**, v. 367, p. 3941–3963, 2009.

GHISSELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 57–66, 2013.

GRACIA-LOR, E. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. **Chemosphere**, v. 87, n. 5, p. 453–462, 2012.

GÜLTEKIN, I.; INCE, N. H. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. **Journal of Environmental Management**, v. 85, n. 4, p. 816–832, 2007.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, v. 46, n. 18, p. 5813–5833, 2012.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors-History, recent state of art and open questions. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2014.

HEISTERKAMP, I.; GANDRASS, J.; RUCK, W. Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC – MS : a tool for identifying estrogenic compounds in water samples? **Anal Bioanal Chem**, p. 709–715, 2004.

HOTCHKISS, A. K. et al. Fifteen years after “wingspread” - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go. **Toxicological Sciences**, v. 105, n. 2, p. 235–259, 2008.

HU, J. Y.; JIN, X.; ONG, S. L. Rejection of estrone by nanofiltration : Influence of solution chemistry. **Journal of Membrane Science**, v. 302, p. 188–196, 2007.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1432–1442, 2011.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saneamento básico**. Rio de Janeiro, 2008. 219 p

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo demográfico de 2010. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações Sobre Validação De Métodos De Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008, de março de 2003.

JANECZKO, A.; SKOCZOWSKI, A. Mammalian sex hormones in plants. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 43, n. 2, p. 71–79, 2005.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2006. p. 273–397.

JELIC, A. et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1165–1176, 2011.

JOBLING, S. et al. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environment Science & Technology**, v. 32, n. 17, p. 2498–2506, 1998.

JOHNSON, A. C.; SUMPTER, J. P. Critical review removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 24, p. 4697–4703, 2001.

JUNGnickel, C. et al. Risk assessment of biocides in roof paint. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 3, p. 258–265, 2008.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSdale, R. M.; GUWY, A. J. The removal of pharmaceuticals , personal care products , endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Research**, v. 43, n. 2, p. 363–380, 2009.

KAWANISHI, M. et al. Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 23, p. 6424–6429, 2004.

KHANAL, S. K. et al. Fate , transport , and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. **Environment Science & Technology**, v. 40, n. 21, p. 6537–6546, 2006.

KIDD, K. A. et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 21, p. 8897–8901, 2007.

KIM, S. D. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 1013–1021, 2007.

KJELDSEN, L. S.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8031–8044, 2013.

KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals , hormones , and other organic wastewater contaminants in U . S . streams, 1999 - 2000 : a national reconnaissance. **Environment Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

KOLPIN, D. W. et al. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. **Science of the Total Environment**, v. 328, p. 119–130, 2004.

KUMAR, V. et al. De-conjugation behavior of conjugated estrogens in the raw sewage , activated sludge and river water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227-228, p. 49–54, 2012.

KUNZ, G. J. et al. Virilization of young children after topical androgen use by their parents. **Pediatrics**, v. 114, n. 1, p. 282–285, 2004.

KUSTER, M. et al. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, n. 1-2, p. 112–123, 2008.

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997–1003, 2009.

KUSTER, M. et al. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. **Chemosphere**, v. 79, n. 8, p. 880–886, 2010.

LEWIS, R. W. Risk assessment of “endocrine substances”: Guidance on identifying endocrine disruptors. **Toxicology Letters**, v. 223, n. 3, p. 287–290, 2013.

LI, J. et al. Science of the Total Environment Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water : A field study along the Chaobai River , Beijing. **Science of the Total Environment**, v. 450-451, p. 162–168, 2013.

LINTELMANN, J. et al. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

LIZ, M. V. DE; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Considerações sobre o preparo de amostras contendo micropoluentes estrogênicos. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1213–1215, 2012.

LORAINÉ, G. A.; PETTIGROVE, M. E. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern california. v. 40, n. 3, p. 687–695, 2006.

LUO, Y. et al. Science of the total environment a review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473-474, p. 619–641, 2014.

MANICKUM, T.; JOHN, W. Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa). **Science of the Total Environment**, v. 468-469, p. 584–597, 2014.

MANTOVANI, A.; FUCIC, A. Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action. **Reproductive Toxicology**, v. 44, p. 15–22, 2014.

MELO, S. A. S. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009.

MELO, S. M.; BRITO, N. M. Analysis and occurrence of endocrine disruptors in Brazilian water by HPLC-fluorescence detection. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, n. 1, 2014.

MENDHAM, J. et al. Vogel: análise química quantitativa. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.

MOREIRA, D. S. et al. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental technology**, v. 30, n. 10, p. 1041–1049, 2009.

MOREIRA, M. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v. 32, n. 12, p. 1409–1417, 2011.

MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de estações de tratamento de esgoto - RTE e estações de tratamento de água - ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na UGRHI-13 (Tietê-Jacaré)**. 186 f. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2009.

NIE, Y. et al. Fate and seasonal variation of endocrine-disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A / A / O process. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 9–15, 2012.

OLIVEIRA, T. M. B. F. et al. Simultaneous electrochemical sensing of emerging organic contaminants in full-scale sewage treatment plants. **Chemical Engineering Journal**, v. 267, p. 347–354, 2015.

OTOMO, J. I. et al. Avaliação de estrógenos nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul , SP . In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS PARA O MEIO AMBIENTE, 2., 2010.

PAL, A. et al. Science of the total environment impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources : Review of recent occurrences , sources , fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062–6069, 2010.

PELAYO, S. et al. A zebrafish scale assay to monitor dioxin-like activity in surface water samples. **Anal Bioanal Chem**, v. 401, p. 1861–1869, 2011.

PENU, R. et al. Graphene and gold nanoparticles based reagentless biodevice for phenolic endocrine disruptors monitoring. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 130–135, 2015.

PETROVIC, M. et al. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 367, n. 1904, p. 3979–4003, 2009.

PINTO, P.; ESTÊVÃO, M.; POWER, D. Effects of estrogens and estrogenic disrupting compounds on fish mineralized tissues. **Marine Drugs**, v. 12, n. 8, p. 4474–4494, 2014.

PLANO INTEGRADO DE SANEAMENTO BÁSICO. Programa estadual de apoio à elaboração de planos municipais de saneamento. Aparecida-SP. 2010, p. 208.

PLOTAN, M. et al. Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1590–1596, 2013.

POLLOCK, M. S.; DUBE, M. G.; SCHRYER, R. Investigating the link between pulp mill effluent and endocrine disruption: attempts to explain the presence of intersex fish in the Wabigoon River, Ontario, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 952–965, 2010.

POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362–373, 2003.

PROCESSOS DE TRATAMENTO DE EFLUENTE. Disponível em: <<http://jorcyaguair.blogspot.com.br/2011/01/processos-de-tratamento-de-efluentes.html>>. Acesso em: 24 out. 2014.

PURDOM, C. E. et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and Ecology**, v. 8, n. 4, p. 275–285, 1994.

QIANG, Z. et al. Chemosphere A comparison of various rural wastewater treatment processes for the removal of endocrine-disrupting chemicals (EDCs). **Chemosphere**, v. 92, n. 8, p. 986–992, 2013.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

REIS, B. J. O rio Paraíba do Sul é monitorado por satélite: boletim SBMET. 2005. 6p. Disponível em: < <http://www.ceivap.org.br/downloads/Benedito.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

REIS FILHO, R. W. et al. Fármacos, ETes, e corpos hídricos. **Revista Ambiente e Água**, v. 2, n. 3, p. 54–61, 2007.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C. DE; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: cpmtanantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817–822, 2006.

REIS FILHO, W. R.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 283–288, 2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e elitroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RICHTER, C. A. et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 199–224, 2007.

RIVAS-RIVERA, N. et al. Screening of endocrine disruption activity in sediments from the Uruguay River. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 6, p. 1137–1142, 2014.

ROCHA, M. J.; CRUZEIRO, C.; ROCHA, E. Development and validation of a GC-MS method for the evaluation of 17 endocrine disruptor compounds, including phytoestrogens and sitosterol, in coastal waters - Their spatial and seasonal levels in Porto costal region (Portugal). **Journal of Water and Health**, v. 11, n. 2, p. 281–296, 2013.

ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 132–155, 2013.

ROGERS, H. R. Sources , behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. **The Science of the Total Environment**, v. 185, p. 3–26, 1996.

RUBIN, B. S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 27–34, 2011.

SAKAMOTO, H.; SHOJI, S.; KANEKO, H. Leaching characteristics of bisphenol A from epoxy-resin pavement materials. **Toxicol Environ Chem**, v. 89, p. 191–203, 2007.

SANT'ANNA, G. L. Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2010, 398 p.

SCHÄFER, A. I.; AKANYETI, I.; SEMIÃO, A. J. C. Micropollutant sorption to membrane polymers : a review of mechanisms for estrogens. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 164, n. 1-2, p. 100–117, 2011.

SCHOKNECHT, U. et al. Leaching of biocides used in façade coatings under laboratory test conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9321–9328, 2009.

SILVA, C. R. et al. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270–276, 2004.

SILVA GUILARDUCI, V. V. DA et al. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1226–1232, 2006.

SILVA, R. F.; SILVA, P. T. S.; SILVA, V. L. Avaliação Da Qualidade Do Efluente Gerado Pelas Ete Do Estado De Pernambuco Em Relação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 19., 2012, p. 12364–12374.

SINGER, H. et al. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 10, p. 3054–3064, 2010.

SOARES, P. V. et al. Mapa de infiltração do alto e médio Vale do Paraíba do Sul com base em elementos do meio físico e na precipitação Map of infiltration of the Paraíba do Sul basin using physical elements and precipitation. **Revista Ambiente e Água**, v. 1, n. 12, p. 26–42, 2008.

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

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 92–98, 2010.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1-4, p. 57–67, 2010.

SPOHR, D. L. et al. Utilização de microrganismos na degradação de hormônios estrógenos. **Revista Liberato**, v. 15, n. 24, p. 105–212, 2014.

SU-HUA, W.; BING-ZHI, D.; YU, H. Adsorption of bisphenol A by polysulphone membrane. **DES**, v. 253, n. 1-3, p. 22–29, 2010.

SUPMED. SUPERINTENDÊNCIA REGIONAL DO MEIO PARAÍBA. Avaliação ambiental do rio Paraíba do Sul – Trecho Funil – Santa Cecília: relatório técnico. Rio de Janeiro: INEA, 2010. 132p.

SWEDENBORG, E. et al. Endocrine disruptive chemicals: Mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 2009.

TAMBOSI, J. L. **Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento**. 141 f. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

THORPE, K. L. et al. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 1142–1149, 2003.

TOMAZ, P. Membrane Bioreator (MBR). In: Rede de esgotos. Cap. 6. p. 1–17.

TOURAUD, E. et al. Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 437–441, 2011.

TRENHOLM, R. A. et al. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 1990–1998, 2006.

VANDENBERG, L. N. et al. Bisphenol-A and the great Divide : a review of controversies in the field of endocrine bisphenol-A and the great divide : a review of controversies in the field of endocrine disruption. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 1, p. 75–96, 2009.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837–1842, 2010.

VIENO, N.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. **Environment Science & Technology**, v. 39, n. 21, p. 8220–8226, 2005.

VULLIET, E.; CREN-OLIVÉ, C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2929–2934, 2011.

WANG, C. et al. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Research**, v. 45, n. 4, p. 1818–1828, 2011.

WELTJE, L. et al. Refinement of the ECETOC approach to identify endocrine disrupting properties of chemicals in ecotoxicology. **Toxicology Letters**, v. 223, n. 3, p. 291–294, 2013.

WRITER, J. H. et al. Fate of 4-Nonylphenol and 17 β -Estradiol in the Redwood River of Minnesota. **Environment Science & Technology**, v. 46, p. 860–862, 2012.

WU, Q. et al. Oxidative removal of selected endocrine-disruptors and pharmaceuticals in drinking water treatment systems, and identification of degradation products of triclosan. **Science of the Total Environment**, v. 439, p. 18–25, 2012.

YAMAMOTO, H. et al. Effects of physical - chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates. **Environment Science & Technology**, v. 37, n. 12, p. 2646–2657, 2003.

YU, Y.; WU, L.; CHANG, A. C. Science of the total environment seasonal variation of endocrine disrupting compounds , pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 310–316, 2013.