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

ROSSANA BORGES TEIXEIRA

Estudo da presença e remoção de hormônios estrogênicos em estação de
tratamento de esgoto por lodos ativados

**2016
Lorena – SP**

ROSSANA BORGES TEIXEIRA

Estudo da presença e remoção de hormônios estrogênicos em estação de
tratamento de esgoto por lodos ativados

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de microbiologia aplicada.

Orientador: Dra. Teresa Cristina Brazil de Paiva

Versão Original

2016
Lorena – SP

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)

Teixeira, Rossana Borges

Estudo da presença e remoção de hormônios
estrogênicos em estação de tratamento de esgoto por
lodos ativados / Rossana Borges Teixeira;
orientadora Teresa Cristina Brazil de Paiva -
Versão Original. - Lorena, 2016.
81 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientadora: Teresa Cristina Brazil de Paiva

1. Hormônios estrogênicos. 2. Esgoto. 3. Efluente.
4. Estrógenos. I. Título. II. Paiva, Teresa Cristina
Brazil de , orient.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu sobrinho Gabriel e a outros como ele que ainda não captaram o poder transformador da educação.

AGRADECIMENTOS

Ao Gustavo por todo apoio e encorajamento, inclusive quando eu mesma duvidei!

Aos meus Pais, Maria Alice e Amilton, que sempre colocaram os nossos estudos como prioridade e as minhas irmãs, Vanessa e Aline, que sempre me tiveram na mais alta conta!

À Dra. Mirela por todas as discussões, 1001 correções, sem um único momento de stress e pelo senso de urgência com o que sempre tratou o meu trabalho!!!

Agradeço à bi-Ms. Érica por me ensinar todas as regras para o não plágio e formatação! Eu sei que se não ajudou mais, foi porque lhe faltou tempo!!!

Aos Companheiros de pós-graduação, mestre e doutores, pela solidariedade, desabafos, discussões, confraternizações, troca de idéias, risadas e compartilhamento de conhecimentos! Valeu, Dr. João, Luiz, Paula, Lucas, Kélen, Guilherme, Gabriela, Patrícia e Juliana!

Um agradecimento extra ao Luiz, pois muito dos feitos aqui relatados foram possível graças aos seus conhecimentos cromatográficos, disposição e patrocínio!!!

Às “minhas” ICs, Natália e Carolzona, pelo bom trabalho realizado e por me acompanharem nesta atribulada jornada!

Agradeço a todos os alunos de IC que passaram pelo laboratório, pois sem cada um de vocês, a família Ecotox não seria a mesma!

Aos funcionários da EEL, em especial à Lucinha, que sempre fez o que pode pela conclusão deste trabalho, ao Manoelzinho sempre disposto a ajudar e ao Cobrinha pelos papos e risos!

Agradeço à Carina Callegari, Eduardo Canaver e Regina Monteiro pelos conhecimentos e experiências compartilhados!

Aos funcionários do SAAE de Jacaré pelo interesse, disposição e pela tentativa!

E à Hannah por me obrigar a parar para esfriar a cuca na pracinha!

Muito obrigada, Pessoal!!!

“...Dream the dreams of other men, you'll be no ones rival...”. Unthought Known, Pearl Jam.

“Um pouco de perfume sempre fica nas mãos de quem oferece flores.”

(Provérbio Chinês)

RESUMO

TEIXEIRA, R. B. **Estudo da presença e remoção de hormônios estrogênicos em estação de tratamento de esgoto por lodos ativados**. 2016. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Hormônios estrogênicos, quando presentes no meio ambiente, podem causar danos ao sistema endócrino de organismos com os quais entram em contato. Estes hormônios são liberados nas fezes e urinas de animais, incluindo os seres humanos, podendo atingir os corpos hídricos e solos. As formas de tratamento aplicadas na maioria das estações de tratamento de esgotos (ETEs), em geral, não são capazes de remover totalmente os hormônios. A remoção dos hormônios tem sido associada ao metabolismo dos micro-organismos, ao tempo de detenção hidráulica, à idade do lodo e à carga de alimentação dentre outros fatores. O objetivo deste estudo foi investigar a remoção dos hormônios estrona (E1), 17- β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17- α -etinilestradiol (EE2) na ETE da Escola de Engenharia de Lorena/USP operando com o sistema de lodos ativados por bateladas sequenciais (SBR), além de estudar a influência da carga de alimentação e da remoção de nitrogênio na remoção destes hormônios. Foram utilizadas cromatografia líquida acoplada a detector UV para a determinação dos hormônios, e análises químicas, físicas e biológicas para a caracterização da ETE. A fim de garantir a confiabilidade dos resultados, foi necessária a validação do método desenvolvido para o preparo e a quantificação dos hormônios, sendo obtidos valores aceitáveis de precisão, coeficiente de variação (CV) entre 0,17 e 8,48 %; exatidão entre 45 e 116 %; e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) satisfatórios para o tipo de detector empregado (UV), entre 60 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de LD e entre 250 e 520 $\mu\text{g L}^{-1}$ de LQ. Entretanto, durante a validação, foi detectado efeito matriz tendo sido necessária a quantificação dos hormônios pelo método de adição de padrão a cada eluato obtido. As elevadas concentrações dos hormônios no esgoto ($5,148 \pm 2,747$; $7,434 \pm 4,356$; $5,200 \pm 3,331$ e $5,638 \pm 4,312 \mu\text{g L}^{-1}$ de E1, E2, E3 e EE2, respectivamente) podem ser atribuídas à baixa geração de esgoto per capita e à possível predominância da urina no esgoto, visto a elevada concentração de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) nestas amostras. O desempenho da ETE para a remoção dos hormônios estrogênicos não foi satisfatório podendo estar relacionada à ineficiente remoção de NTK (-4 %), ao curto tempo de detenção hidráulica deste sistema (2h05min), além da ocorrência da desconjugação durante o tratamento, dado o curto tempo entre a geração e a ETE, o que pode ser insuficiente para a desconjugação antes da chegada a ETE.

Palavras-chave: Hormônios estrogênicos. Esgoto. Efluente. Estrógenos.

ABSTRACT

TEIXEIRA, R. B. **Study on presence and remove of estrogenic hormones in a sewage treatment plant for activated sludge.** 2016. 81 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Some damages can be caused to endocrine systems of organisms if environment contains estrogenic hormones. Estrogens are released in feces and urine of animals, including humans, and may reach soils and water bodies. Most of systems in use as wastewater treatments are not capable of removing these hormones. Some factors can impact on it, as the kind of microorganisms metabolism, hydraulic retention time, sludge age and organic load. The objectives of this work were to investigate the removal of estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) and 17 α -ethynylestradiol (EE2) hormones in sewage treatment plant (STP), at Lorena School of Engineering, with secondary treatment based on activated sludge into a sequencing batch reactor (SBR) and to study the influence of organic load and nitrogen removal on estrogens remotion. Liquid chromatography coupled to UV detector was applied to estrogens determination and chemical, physical and biological analyses were used to STP's characterization. Extraction and quantification method was validated by the assays of linearity; precision, with RSD values between 0.17 and 8.48 %; and accuracy, which presented recuperation between 45 and 116% for these four estrogens. Limits of detection values, between 60 and 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$, and limits of quantification values, between 250 and 520 $\mu\text{g.L}^{-1}$, are consistent with the detector used (UV). However, matrix effect was detected along validation, consequently it was necessary to employ post-extraction addition method of standards into each eluate. High concentrations of estrogens in sewage (5.148 ± 2.747 ; 7.434 ± 4.356 ; 5.200 ± 3.3314 e 5.638 ± 4.312 $\mu\text{g L}^{-1}$ of E1, E2, E3 e EE2) could be attributed to the reduced sewage generation and to the possible predominance of urine in the sewage, due to high NTK measured. The poor performance could be associated to inefficient removal of NTK (-4 %); to short hydraulic retention time applied (2h05min); besides the occurrence of deconjugation during biologic treatment, due to short transit between generation and STP which can be insufficient to deconjugate before STP.

Keywords: Estrogenic hormones. Sewage. Effluent. Estrogens.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Cromatograma dos hormônios E1, E2, E3 e EE2 a 10 mg L ⁻¹ de acordo com o Chaves (2015).	43
Figura 2 - Esquema de funcionamento da ETE da EEL/USP.....	48
Figura 3 - Divisão do tempo de um ciclo de operação da ETE.	48
Figura 4 - Cromatogramas obtidos pelos dois métodos. A. cromatograma com método Chaves (2015); B. cromatograma após modificações.....	52
Figura 5 - Exemplo de curvas obtidas no estudo da seletividade com adição de padrão antes da extração.	58
Figura 6 - Exemplo de curvas obtidas no estudo da seletividade por fortificação dos eluatos.	60
Figura 7 - Exemplo de curva obtida através da adição de padrão em diferentes concentrações.	62
Figura 8 - Resultados médios e desvio padrão dos hormônios no esgoto bruto e no efluente tratado.	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características e propriedades dos estrogênios E1, E2, E3 e EE2.	28
Tabela 2 - Valores aceitáveis para a precisão e exatidão de acordo com a concentração do analitos.	36
Tabela 3 - Condições cromatográficas para análise de ânions	40
Tabela 4 - Condições de análise dos hormônios	42
Tabela 5 - Resultados das análises físicas e químicas nas amostras de esgoto bruto e efluente.....	51
Tabela 6 - Comparativo entre as áreas dos picos obtidos a partir da detecção nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm para uma mesma solução dos hormônios a 10 mg L ⁻¹	53
Tabela 7 - Resultados do ensaio de exatidão por recuperação em 3 diferentes níveis de fortificação com os hormônios E1, E2, E3 e EE2.	54
Tabela 8 - Precisão obtida para os hormônios E1, E2, E3 e EE2 nos 3 níveis de concentração	56
Tabela 9 - Faixa de CV obtidas em outros trabalhos consultados na literatura.....	56
Tabela 10 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método modificado.....	57
Tabela 11 - Resultados da avaliação da linearidade do método modificado para os hormônios E1, E2, E3 e EE2.	58
Tabela 12 - Coeficientes angulares das retas obtidos pela extração de amostras fortificadas em matriz aquosa e efluente e a relação entre estes.....	59
Tabela 13 - Coeficientes angulares das retas obtidos pela fortificação dos eluatos e por amostras padrão preparadas em acetonitrila e a relação entre estes.	60
Tabela 14 - Resultados obtidos na validação do método modificado.....	62
Tabela 15 - Concentrações em µg L ⁻¹ dos hormônios estrogênicos por amostra de efluente tratado avaliada.	65
Tabela 16 - Eficiências de remoção dos hormônios calculadas a partir das concentrações determinadas.	67
Tabela 17 - Resultados de eficiência de remoção de nitrogênio, tempo de detenção hidráulica e carga alimentada por batelada avaliada.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
CG	Cromatografia gasosa
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de variação
C18	Octadecil silano
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EFS	Extração em Fase Sólida
EEL/USP	Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
E1	Estrona
E2	17- β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17- α -etinilestradiol
KOW	Coeficiente de Partição Octanol-água
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MS	Espectrômetro de massa
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
ORP	Potencial de oxi-redução
SBR	Reator em bateladas sequenciais
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1.	Sistema endócrino e os hormônios estrogênicos	24
2.2.	Interferência ao sistema endócrino	25
2.3.	A presença de estrogênios no meio ambiente	26
2.4.	Estações de tratamento de esgotos e a remoção dos estrogênios	28
2.5.	Lodos ativados	30
2.5.1.	Remoção de nitrogênio em sistema de lodos ativados	31
2.5.2.	Tipos de sistemas de lodos ativados	32
2.6.	Análise de hormônios estrogênicos em amostras ambientais.....	33
2.6.1.	Determinação e quantificação de hormônios – cromatografia	33
2.6.2.	Preparo da amostra líquida– extração em fase sólida	34
2.7.	Validação de método analítico.....	35
2.8.	Considerações finais	36
3	OBJETIVOS	37
3.1.	Geral.....	37
3.2.	Específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1.	Pesquisa das estações de tratamento de esgotos (ETE) da região e seleção da ETE de estudo	38
4.2.	Pontos de coleta	38
4.3.	Coleta de amostras	38
4.4.	Caracterização do sistema de tratamento de esgoto.....	39
4.5.1.	pH, temperatura e condutividade	39
4.5.2.	Demanda química de oxigênio (DQO)	39
4.5.3.	Nitrogênio total Kjeldhal (NTK)	39
4.5.4.	Fósforo total (FT).....	39
4.5.5.	Identificação e quantificação da microfauna de lodos aeróbios	40
4.5.6.	Determinação de ânions.....	40
4.5.	Determinação dos hormônios estrogênicos	41
4.5.1.	Preparo das amostras e frações líquidas	41
4.5.2.	Quantificação dos hormônios	41

4.5.3. Preparo das soluções	42
4.6. Adaptação e validação da metodologia analítica	42
4.6.1. Exatidão por teste de recuperação.....	43
4.6.2. Precisão	44
4.6.3. Limites de detecção e de quantificação.....	44
4.6.4. Seletividade.....	45
4.6.5. Linearidade.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Pesquisa das Estações de tratamento de esgoto na região	47
5.2. Caracterização do sistema de tratamento de esgoto	47
5.3. Adaptação e validação do método analítico.....	52
5.3.1. Exatidão	53
5.3.2. Precisão	55
5.3.3. Limites de detecção e de quantificação.....	57
5.3.4. Linearidade.....	57
5.3.5. Seletividade.....	58
5.4. Determinação dos hormônios.....	63
5.4.1. Esgoto Bruto	63
5.4.2. Efluente Tratado.....	64
5.4.3. Remoção dos hormônios na ETE.....	67
6 CONCLUSÕES	70
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Interferentes endócrinos são compostos químicos exógenos que causam perturbação ao sistema endócrino dos organismos e de seus descendentes e podem ser assim chamados apenas se houver comprovação científica das alterações (GUISELLI; JARDIM, 2007).

Entre os interferentes endócrinos, destacam-se os hormônios estrogênicos artificiais e os naturais, produzidos por animais e plantas que, independente da origem, podem causar danos aos sistemas reprodutivos de espécies aquáticas, bem como, as espécies não aquáticas, que se utilizam de águas de abastecimento, irrigação ou indiretamente pela ingestão de organismos contaminados (IPCS, 2002; LANGE et al., 2001; LARSSON et al., 1999).

A similaridade no funcionamento dos sistemas endócrinos de diferentes grupos de animais, frente aos hormônios produzidos e utilizados, causa a toxicidade. Os efeitos variam desde a redução na taxa de crescimento e o aparecimento de casos de hermafroditismo em peixes, até casos de câncer em seres humanos (IPCS, 2002; LANGE et al., 2001; LARSSON et al., 1999).

As Estações de tratamento de esgoto (ETE) podem reduzir a quantidade dos hormônios presentes nos esgotos e este potencial de remoção dos estrogênios está relacionada a fatores como: (i) o tipo de tratamento empregado nas ETEs: primário (remoção de sólidos em suspensão), secundário (remoção de matéria orgânica solúvel) e terciário (remoção de nutrientes); (ii) o tipo de metabolismo dos micro-organismos: aeróbio ou anaeróbio e (iii) parâmetros operacionais do tratamento secundário: temperatura, tempo de detenção hidráulica e idade de lodo (JOHNSON, 2005; JOHNSON; SUMPTER, 2001; REN et al., 2007; TERNES; KRECKEL; MUELLER, 1999).

Desta maneira, os objetivos deste estudo incluem a avaliação da presença dos hormônios estrogênicos no esgoto e no efluente tratado em uma ETE com tratamento secundário utilizando lodos ativados; a caracterização da ETE pela avaliação de alguns parâmetros de projeto e operacionais (temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica, remoção de matéria orgânica, carga de alimentação e a remoção de nutrientes); e a observação do impacto dos parâmetros da ETE com a remoção dos hormônios estrogênicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistema endócrino e os hormônios estrogênicos

O sistema endócrino dos organismos vivos tem como função principal regular as atividades metabólicas, por meio da produção e ação de compostos químicos específicos, os hormônios (HALL, 2011).

Nos mamíferos, algumas das funções dos hormônios são: o aumento da velocidade de reações químicas gerada pelos hormônios da tireoide, a regulação da absorção da glicose pelas células do organismo por meio da insulina, o desenvolvimento de características sexuais femininas reguladas pelos estrogênios, entre outras. Alguns hormônios também influenciam na expressão ou ação de outro hormônio, mesmo que estes sejam produzidos em órgãos diferentes do corpo (HALL, 2011; IPCS, 2002).

Existem semelhanças entre os sistemas endócrinos de diferentes grupos de animais (anfíbios, répteis, peixes, aves, entre outros) que vão desde a similaridade dos órgãos produtores e de regulação, forma de ação, até os hormônios produzidos, sendo os estrogênios e os androgênios são bastante comuns em diferentes espécies (IPCS, 2002).

Os hormônios estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e estriol (E3) são os únicos hormônios estrogênicos presentes em quantidades significativas no plasma feminino humano. O 17- β -estradiol (E2) é o principal estrogênio secretado pelos ovários. A estrona (E1) pode ser secretada nos ovários ou formada a partir de androgênios nos tecidos periféricos. O estriol (E3) é um produto oxidativo da estrona e do 17- β -estradiol sendo formado principalmente no fígado (HALL, 2011).

Alguns hormônios podem atuar em quase todos os tecidos ou células dos organismos, outros agem apenas em tecidos alvos por exigir receptores específicos para a sua ação (HALL, 2011). Os hormônios estrogênicos se encaixam nesta última classe, visto que são transportados pelo sangue, porém, atuam apenas em células-alvo, que possuem proteínas receptoras específicas no citoplasma celular (HALL, 2011; SCHMIDT-NIELSEN, 2011). Após a conexão com a proteína receptora específica, o complexo formado imediatamente se desloca até o núcleo celular, onde induz a expressão de informações genéticas (JENSEN et al¹, 1971 apud SCHMIDT-NIELSEN, 2011).

¹ JENSEN, E. et al. Hormone-receptor interaction as a guide to biochemical mechanism. **Biochemistry of steroid hormone action**, Biochemical Society Symposium, Cambridge, v. 32, p. 133-159, 1971.

O transporte dos hormônios estrogênicos pelo sangue pode ocorrer na forma conjugada às proteínas plasmáticas, globulina ou albumina, ou na forma livre. Apenas os estrogênios na forma livre podem se ligar aos receptores localizados nas membranas das células alvo para atuação. Porém, os hormônios ligados às proteínas plasmáticas podem ser desconjugados fornecendo hormônios livres para ação (HALL, 2011; IPCS, 2002).

Os efeitos dos estrogênios estão relacionados à maturação dos órgãos femininos, crescimento de tecidos relacionados à reprodução e proliferação celular. Porém, estes hormônios não são restritos à regulação da reprodução e, também, influenciam na formação dos ossos, do tecido adiposo, dos sistemas digestivo, imunológico e cardiovascular (HALL, 2011; IPCS, 2002).

Devido a estas funções, os hormônios estrogênicos sintéticos, como o 17- α -etinilestradiol (EE2) e o mestranol (MeEE2), e os idênticos aos naturais são prescritos como anticoncepcionais, para a diminuição dos incômodos da menopausa (alterações de humor, ondas de calor, etc.), da osteoporose e do risco de câncer de cólon em mulheres após o climatério (PARDINI, 2014; RUSSO, 2001; SCHMIDT, 2012).

O excesso de estrogênios, naturais ou sintéticos, presentes no organismo é metabolizado no fígado para a formação de conjugados sulfatados e glicuronídeos, que são formas mais hidrossolúveis dos estrogênios, sendo assim, excretados na urina. Caso não ocorra a conjugação, os estrogênios livres são eliminados nas fezes (HALL, 2011). Devido a estas vias de liberação, os estrogênios são normalmente encontrados no esgoto doméstico e corpos hídricos (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

2.2. Interferência ao sistema endócrino

Os estrogênios podem causar alterações à vida aquática por interferir no sistema endócrino da fauna presente nos corpos hídricos.

Estrogênios são, principalmente, hormônios reprodutivos femininos e com isto, seus efeitos desreguladores se manifestam, sobretudo, por meio do surgimento de características femininas em espécies masculinas, como a produção de vitelogenina e o desenvolvimento de ovas em peixes. Esta última tornando-os hermafroditas ou intersexuais (LANGE et al., 2001; TANNA et al., 2013). Em espécies femininas, ocorre a maturação sexual precoce conforme verificado nos trabalhos de Amstislavsky et al. (2004) e de Larsson et al. (1999).

A presença dos estrogênios em corpos hídricos, mesmo em concentrações da ordem de ng L^{-1} , também foi relacionada ao menor comprimento e peso do corpo de peixes machos, menor produção de espermatozoides, ausência de desenvolvimento de características secundárias masculinas ao longo do ciclo de vida e aparecimento de deformidades fisiológicas extremas. Os efeitos nocivos relacionados aos estrogênios não ficaram restritos à geração exposta e se estenderam à prole. Foi observado ainda que as fêmeas da segunda geração apresentaram redução no número e comprimento das larvas geradas (LANGE et al., 2001; TANNA et al., 2013).

Outro fator importante a ser considerado é a relação entre o impacto das alterações do sistema endócrino e a etapa da vida do organismo exposto, principalmente na fase fetal, quando o sistema endócrino está em desenvolvimento e é mais sensível à exposição. Nesta fase, podem ocorrer mudanças irreversíveis, ao contrário da exposição na fase adulta (IPCS, 2002).

Hackney (2007) estudou o efeito do 17- β -estradiol (E2) e do 17- α -etinilestradiol (EE2) sobre o desenvolvimento e crescimento de larvas de sapos *Xenopus laevis*, na fase de determinação de gêneros, expostas por um período de 21 dias. Os resultados mostraram que o desenvolvimento das larvas ocorreu de forma mais acelerada em relação ao controle (larvas sem exposição aos hormônios). Entretanto foi verificado que o crescimento total dos organismos foi bastante prejudicado.

Amstislavsky et al. (2003) trataram fêmeas de camundongo com a aplicação em dose única de 1 μg de estradiol (E2) no segundo dia da gestação. Observaram ao menos duas características decorrentes da atividade estrogênica dessa substância: as fêmeas das proles apresentaram abertura adiantada da vagina, evidenciando maturação precoce; e os machos das proles apresentaram feminização verificada pelo encurtamento da distância anogenital (AGD), um indicador de dimorfismo sexual.

Os resultados apresentados no IPCS (2002) mostraram também que a exposição crônica não causa, necessariamente, os mesmos efeitos observados na exposição aguda, pois o impacto e a permanência dos efeitos dependem do estágio da vida em que a exposição ocorre.

2.3. A presença de estrogênios no meio ambiente

Como já mencionado, os hormônios estrogênicos são liberados pelos organismos nas fezes na forma livre e na urina na forma conjugada como sulfatos ou

glucoronídeos. A conjugação é uma forma encontrada pelo organismo para inativar os hormônios e torná-los mais hidrossolúveis (HALL, 2011).

Nos mamíferos, os hormônios conjugados são excretados em maior concentração como glucorohormônios do que como sulfatohormônios. Entretanto, no esgoto e nos cursos d'água, os glucorohormônios são encontrados em baixíssimas concentrações. Um indicativo de que glucorohormônios são mais suscetíveis ao ataque por micro-organismos do trato intestinal, como a *E.Coli*, do que os sulfatohormônios (D'ASCENZO et al., 2003; KUMAR et al., 2011).

D'Ascenzo et al. (2003) determinaram a relação entre os dois tipos de hormônios conjugados e os hormônios livres em amostras de urina e em esgoto. Para isto, coletaram amostras de urina de 73 mulheres e de esgoto recém descartado. Na urina, 79 % dos hormônios presentes estavam conjugados a grupamentos glicurosídeo, 21 % sulfatados e as formas livres não foram detectadas. No esgoto, esta proporção foi alterada para 21 % e 31 % de hormônios conjugados a glicurosídeo e sulfatos, respectivamente, seguido do aparecimento de 48 % dos hormônios na forma livre.

Kumar et al. (2012) utilizaram três diferentes microcosmos: esgoto, lodos ativados e água de rio. Adicionaram separadamente a cada amostra coletada sulfatohormônios e glucorohormônios. Observaram que os glucorohormônios foram rapidamente e, quase, totalmente, convertidos às formas livres tanto nas amostras de esgoto bruto quanto nas amostras de água de rio. Por outro lado, hormônios sulfatados sofreram desconjugação apenas nas amostras de lodos ativados.

Em trabalho anterior, Kumar et al. (2011) estudaram a presença de hormônios estrogênicos, conjugados e livres, em efluente de estações de tratamento de esgoto e em águas de rios do Japão. Os resultados mostraram que os sulfatohormônios foram encontrados em 33 amostras em concentrações variadas, porém menores do que 4 ng.L^{-1} , enquanto os glucorohormônios não foram detectados.

Os resultados encontrados na literatura revelaram que os estrogênios naturais estrona (E1), 17β -estradiol (E2) e estriol (E3) são os mais detectados nos esgotos. Entre os artificiais, destacaram-se o 17α -etinilestradiol (EE2), usado por seus efeitos anticoncepcionais ou em terapias de reposição hormonal (D'ASCENZO et al., 2003; KUMAR, 2011; LARSSON et al., 1999).

As características e as propriedades dos hormônios que foram estudados neste trabalho são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características e propriedades dos estrogênios E1, E2, E3 e EE2.

Composto		Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹) a 20°C	Coefficiente de partição água/octanol Log K _{ow}	Atividade Estrogênica relativa ao E2	Estrutura
Estrona	E1	270,4	13	3,43	2,54
17-β-estradiol	E2	272,4	13	3,94	100
Estriol	E3	288,4	13	2,81	17,6
17-α-etinilestradiol	EE2	296,4	4,8	4,15	246

Fonte: Adaptado a partir de Combalbert e Hernandez-Raquet (2010) e de Silva, Otero e Esteves (2012).

2.4. Estações de tratamento de esgotos e a remoção dos estrogênios

As estações de tratamento de esgoto (ETE) têm importante função na redução da carga de hormônios lançada em corpos hídricos, pois mesmo os tratamentos biológicos mais simples, contribuem com alguma remoção destes hormônios. Isto porque, em tratamento de esgotos, além das biotransformações, a sorção ao lodo de um dado composto também conta como remoção (BARONTI et al., 2000).

No estudo de Stanford e Weinberg (2010) foi avaliada a remoção dos hormônios estrogênicos em diferentes ETEs descentralizadas. Remoções de estrona (E1) superiores a 58 %, de cerca de 50 % e de até 80 % foram reportadas em *wetlands* aeróbias, em *wetlands* anaeróbias e em filtros aeróbios, respectivamente. Assim como em outras pesquisas de remoção de hormônios, notou-se que tratamentos biológicos aeróbios promovem maior remoção desta substância do que tratamentos anaeróbios.

Johnson et al. (2005) também determinaram, entre outras micropoluentes, a presença de estrona (E1) em efluentes de diferentes ETEs instaladas na Europa e calcularam a eficiência de remoção destas utilizando o modelo de Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000), posteriormente aperfeiçoado por Johnson et al. (2004), para a estimativa das concentrações destes micropoluentes no esgoto. Não foi detectada a remoção de E1 em ETE de tratamento primário por precipitação química. Entretanto, 84 % deste composto foi removido em sistema de filtro aerado submerso e 59 a 99 % em estações com tratamento secundário com lodos ativados em diferentes condições de operação.

A variação da eficiência de remoção de hormônio registrada por estes autores, foi relacionada às diferentes condições operacionais empregadas nas ETEs. Foi encontrada

correlação direta entre eficiência de remoção do E1 com o tempo de detenção hidráulica (TDH) e o tempo de retenção de sólidos (TRS).

Dentre os hormônios naturais, o E1 tem apresentado a menor eficiência de remoção em ETEs, provavelmente, devido à biodegradação de outros hormônios estrogênicos conjugados e livres a E1. Visto que este hormônio tem sido encontrado em efluentes, mesmo quando ausente do esgoto inicial (ALVARINO et al., 2014; D'ASCENZO et al., 2003; KUMAR et al., 2012; ZHENG et al., 2013).

A remoção de 17- β -estradiol (E2) foi avaliada em duas ETEs com tratamento secundário por lodos ativados por Ferreira (2013), ambas em operação no Rio de Janeiro. Foram encontrados valores de remoção de E2 de 77 % e 73 %. Nestas ETEs, o fósforo foi removido biologicamente de forma parcial (50 %) concomitantemente com remoção de nitrogênio total acima de 97%.

Muz et al. (2014) estudaram a remoção de interferentes endócrinos adicionados ao esgoto, entre estes a estrona (E1). Usaram reator sequencial anaeróbio/aeróbio operado em escala de laboratório voltado para a remoção de fósforo. Mais de 90% da quantidade de estrona foi removida do efluente neste tipo de tratamento, porém, deste total removido, cerca de 5 a 20 % permaneceu sorvido ao lodo.

Os valores de partição octanol-água (K_{ow}), expressos como $\log K_{ow}$, dos hormônios estrogênicos indicam que a sorção no lodo das ETEs pode representar uma forma de remoção. Entretanto, os micro-organismos constituintes do lodo são muito eficientes na biodegradação dos compostos sorvidos, como demonstrado por Janex-Habibi et al. (2009).

A maior eficácia da biodegradação foi corroborada pelo trabalho de Alvarino et al. (2014). Menos de 5 % dos estrogênios aplicados às amostras de esgotos sintéticos permaneceram sorvidos no lodos ativados e no lodo anaeróbio, após 24 horas de tratamento. Resultados similares, também, foram obtidos por Xue et al. (2010) em todas as etapas em um sistema de tratamento de esgoto anaeróbio/anóxico/aeróbio/membrana (A₂OM).

O 17- α -Ethinilestradiol (EE2) apresentou os maiores valores de sorção pelo lodo que parecem estar relacionados ao maior valor de K_{ow} quando comparado aos K_{ow} dos outros estrogênios estudados (Xue, 2010). O efeito negativo do alto coeficiente de sorção pelo lodo está diretamente relacionado com o risco de contaminação dos solos. Quando os lodos são dispostos em aterros sanitários ou utilizados em área agrícolas, os hormônios

sorvidos podem ser lixiviados ou carreados para os corpos hídricos, principalmente em estações chuvosas (SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012).

Ren et al. (2007) estudaram a remoção dos hormônios estrogênicos (E1, E2, E3 e EE2) utilizando lodos ativados nitrificante com substratos contendo: (i) glicose combinada com amônia, (ii) amônia e (iii) glicose. A taxa de biodegradação dos hormônios em meio contendo apenas amônia e glicose e amônia foram similares ($0,070 \text{ h}^{-1}$). Porém em meio contendo unicamente glicose como substrato foi observada redução na taxa de biodegradação ($0,042 \text{ h}^{-1}$). Também foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre as taxas de biodegradação hormonal. Os autores verificaram que a biodegradação dos hormônios foi inversamente proporcional à concentração de glicose no substrato. Estes resultados foram similares aos obtidos em ETEs quando a razão alimento/micro-organismos (A/M) foi alta. Exceto para o estriol (E3) que apresentou relação direta, provavelmente, por ser o mais hidrofílico destes hormônios, o que favoreceria uma via de degradação diferenciada.

Estes estudos deixam claro que maiores taxas de remoção de hormônios são obtidas em estações de tratamento de esgotos projetadas não só para a remoção de matéria orgânica carbonácea (tratamento secundário). Logo, é essencial projetá-las, também, para remoção biológica de nitrogênio (tratamento terciário).

2.5. Lodos ativados

O sistema de lodos ativados é a forma de tratamento de esgoto mais utilizado mundialmente, principalmente, devido às altas taxas de remoção de matéria orgânica e de sólidos suspensos. A remoção de compostos orgânicos é promovida pela presença de oxigênio decorrente do processo de aeração. O oxigênio atua como receptor de elétrons para o metabolismo oxidativo dos macrocompostos transformando-os, principalmente, em gás carbônico (CO_2) e água (HAANDEL; LUBBE, 2012; HORAN, 2003).

Este processo é bem efetivo, graças à grande concentração de biomassa em suspensão. A formação natural de agregados de micro-organismos, os flocos de lodo, permite a separação da massa microbiana por sedimentação e o reuso desta no tratamento de esgoto (HAANDEL; LUBBE, 2012; HORAN, 2003).

Os flocos de lodo são formado por dois principais componentes: (i) o biológico composto de bactérias, fungos, protozoários e alguns metazoários; (ii) o não biológico consistindo de particulados orgânicos e inorgânicos, provenientes do esgoto, e polímeros

extracelulares produzidos pelos próprios micro-organismos (polissacarídeos e enzimas hidrolíticas, por exemplo) ou produtos da respiração endógena (degradação e estabilização dos micro-organismos com liberação de conteúdo intracelular, por exemplo, DNA e proteínas) (JENKINS; RICHARD; DAIGGER, 1993; LIAO et al., 2001).

A fração biótica dos flocos de lodo é composta de micro-organismos decompositores, as bactérias, e micro-organismos consumidores, os diferentes protozoários e pequenos metazoários. As bactérias, além de oxidar a maior parte da matéria orgânica, são as maiores responsáveis pela formação dos agregados de organismos (bactérias formadoras do floco), bem como por sua estrutura (bactérias filamentosas), o que permitem a formação de flocos sedimentáveis (JENKINS; RICHARD; DAIGGER, 1993; MADONI, 2003).

Os organismos consumidores, além de reduzirem o teor de matéria orgânica em suspensão, por se alimentarem de organismos dispersos (bactérias e protozoários de vida livre) e bactérias formadoras do floco, também são excelentes indicadores das condições operacionais predominantes no sistema de lodos ativados, por meio da avaliação da diversidade e abundância dos grupos de organismos presentes (JENKINS; RICHARD; DAIGGER, 1993; MADONI, 2003).

2.5.1. Remoção de nitrogênio em sistema de lodos ativados

Os sistemas de lodos ativados convencionais foram com o tempo otimizados para remover, também, nitrogênio e fósforo, compostos que favorecem a eutrofização dos corpos hídricos (HAANDEL; LUBBE, 2012; HORAN, 2003).

Frequentemente, a remoção biológica de nitrogênio em sistemas de lodos ativados ocorre em duas etapas: a nitrificação autotrófica e a desnitrificação heterotrófica, que exigem condições específicas para que ocorram em altas taxas (METCALF; EDDY, 2003).

A nitrificação autotrófica acontece em duas etapas, envolvendo grupos diferentes de micro-organismos: (i) os que oxidam a amônia a nitrito, dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira*; (ii) os que oxidam nitrito a nitrato, dos gêneros *Nitrobacter* e *Nitrococcus* (METCALF; EDDY, 2003).

Ambos os grupos de micro-organismos envolvidos na nitrificação autotrófica têm uma taxa de crescimento menor do que os heterotróficos presentes no lodo ativado. Desta maneira, uma alta idade de lodo ou tempo de retenção de sólidos deve ser mantida, além de fornecimento de oxigênio para a oxidação da amônia a nitrito e do nitrito a nitrato (METCALF; EDDY, 2003).

Na desnitrificação heterotrófica, micro-organismos heterotróficos facultativos utilizam nitrato e nitrito como aceptores de elétrons na cadeia respiratória e compostos orgânicos atuam como doadores de elétrons. Este processo pode levar à redução do nitrogênio até a forma gasosa. Sendo assim, a ausência de oxigênio (ambiente anóxico) e a presença de compostos orgânicos são necessárias para a desnitrificação heterotrófica (HAANDEL; EKAMA; MARAIS, 1980; METCALF; EDDY, 2003).

Em sistemas de lodos ativados desnitrificante contínuo, a nitrificação e a desnitrificação ocorrem em tanques diferentes com condições propícias a cada uma destas etapas. Em sistemas intermitentes com tanque único, a remoção biológica de nitrogênio pode ocorrer de forma simultânea quando pequenos ciclos de aeração/não aeração são utilizados ou de forma sequencial quando ciclos mais longos são utilizados (HAANDEL; LUBBE, 2012; ZHAO et al. 1999).

2.5.2. Tipos de sistemas de lodos ativados

Existem diversas configurações de sistemas de lodos ativados que podem variar quanto: (i) ao material a ser removido: apenas matéria orgânica carbonácea ou também nutrientes (N e P); (ii) ao tipo de mistura: completa ou fluxo de pistão; (iii) forma de alimentação: contínua ou intermitente (HAANDEL; LUBBE, 2012; HORAN, 2003; METCALF; EDDY, 2003).

Os sistemas de lodos ativados mais comumente encontradas (convencional, aeração prolongada e bateladas sequenciais (SBR)) são discutidos a seguir (METCALF & EDDY, 2003).

No sistema de lodo ativado convencional, o esgoto bruto é recebido em um clarificador primário para depois seguir para o tanque de aeração. O clarificador permite a redução da carga orgânica a ser alimentada e removida no tanque de aeração pela remoção de materiais sedimentáveis. Com isto, o consumo de oxigênio no tanque de aeração é reduzido em relação aos outros tipos, porém é mais susceptível ao crescimento excessivo de bactérias filamentosas, conhecido como bulking, devido à baixa relação alimento/micro-organismo. Neste tipo de sistema, o tempo de detenção hidráulica (TDH) varia entre 6 e 8 horas no tanque de aeração e a idade do lodo ou tempo de retenção de sólidos (TRS) é mantido entre 3 e 15 dias. Portanto, esse sistema não visa à nitrificação intencional, visto a baixa taxa de crescimento dos organismos responsáveis por este processo (METCALF; EDDY, 2003; OLIVEIRA; SPERLING, 2011; SPERLING, 1997).

O sistema de aeração prolongada, além de não contar com o clarificador primário, opera com maiores tempos de detenção hidráulica, entre 16 e 24 horas, e de retenção de sólidos, entre 20 e 30 dias, prevendo o crescimento dos micro-organismos nitrificantes e a estabilização do lodo. Com isto, o consumo de oxigênio e o tamanho dos tanques são maiores do que no sistema convencional. Porém, tem como vantagens, a nitrificação e a menor geração de lodo excedente a ser estabilizado e descartado (METCALF; EDDY, 2003; OLIVEIRA; SPERLING, 2011; SPERLING, 1997).

No sistema de batelada sequencial (SBR) todas as etapas acontecem em um único tanque (enchimento, aeração/reação, clarificação e esvaziamento) em intervalos de tempo sequenciais. Este sistema é bastante flexível e mudanças nos parâmetros operacionais podem ser feitas para melhorar a remoção de nutrientes. O aumento do tempo de retenção de sólidos e a aeração intermitente para criação de condições anóxicas e anaeróbicas intercaladas com a aerobiose para remoção de nitrogênio e fósforo são exemplos de modificações adotadas (METCALF; EDDY, 2003; SPERLING, 1997).

2.6. Análise de hormônios estrogênicos em amostras ambientais

2.6.1. Determinação e quantificação de hormônios – cromatografia

Como os hormônios naturais e artificiais são encontrados nos esgotos e nos corpos hídricos em concentrações que variam de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} , estas substâncias são em geral determinadas por cromatografia gasosa (CG) ou líquida de alto desempenho (CLAE), através da detecção por espectrometria de massa (ES), UV/Visível ou fluorescência. Devido às características químicas dos hormônios, como a baixa polaridade, são utilizadas fases estacionárias apolares ou pouco polares (CANAVER, 2012; LIMA et al., 2013).

Além da cromatografia, métodos que medem a estrogenicidade relativa da amostra correlacionando-a ao potencial estrogênico de um dado padrão, geralmente, o estradiol, são bastante utilizados, por apresentarem resultados rápidos e mais acessíveis, todavia de forma qualitativa. Ensaio com células in vitro, com levedura recombinante e exames histológicos em peixes são alguns exemplos de métodos que apontam um nível de estrogenicidade, porém sem identificar os compostos responsáveis (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010; KUMAR et al., 2011; SERVOS et al., 2005; TANNA et al., 2013).

2.6.2. Preparo da amostra líquida– extração em fase sólida

Esgotos são matrizes complexas por apresentarem uma ampla variedade de compostos que podem estar dispersos em uma mesma solução aquosa, sendo os compostos estrogênicos apenas mais uma classe entre tantas outras que podem estar presentes. Por conseguinte, para que os estrógenos possam ser corretamente analisados, devem ser isolados, o que pode ser feito através de Extração em Fase Sólida (EFS) (MUZ et al., 2012).

A EFS é um método de separação com o uso de um sorvente, que pode estar retido em cartuchos ou barris ou discos. A amostra é filtrada e interage com a fase estacionária, a qual retém os compostos de interesse (JARDIM, 2010).

Se o objetivo da EFS for o isolamento da matriz para estocagem, os compostos retidos no sorvente não precisam ser recuperados, mas se o interesse for a extração e a concentração de analitos, é necessária a realização das etapas posteriores de clarificação, com um determinado solvente para a remoção de interferentes e posterior eluição dos compostos de interesse com outro solvente (JARDIM, 2010; RAYNIE; WATSON, 2014).

A seleção dos agentes de extração é imprescindível para o alcance do objetivo desejado, devendo-se atentar para alguns pontos descritos a seguir (RAYNIE; WATSON, 2014).

O sorvente pode ser polar, apolar ou trocador de íons, sendo indicada a utilização de um com características semelhantes ao do analito. As características priorizadas são: propriedades iônicas, presença de anel benzênico e polaridade. Além disto, em caso de uso de sorvente apolar, o condicionante deve ser mais polar do que o sorvente e menos polar do que a matriz proposta, para que possa ativar e ajustar a força do sorvente antes da aplicação da amostra. O uso de sorventes polares pode dispensar esta etapa, apesar de ser também recomendado pelo seu potencial de remoção de sujidades aderidas ao sorvente no processo de fabricação.

Na etapa de clarificação, o solvente de limpeza escolhido deve ter força intermediária ao sorvente e ao eluente para que remova os interferentes aderidos, mas não os analitos de interesse. O eluente deve ser forte o suficiente para romper as interações entre o analito e o sorvente, porém sem força para romper ligações com outros interferentes.

2.7. Validação de método analítico

A validação de métodos analíticos garante a confiabilidade e qualidade dos resultados obtidos. Este conjunto de procedimentos se faz necessário para o desenvolvimento de um novo método ou na adaptação de um método já desenvolvido (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Os critérios a serem empregados na validação de um método analítico variam de acordo com a finalidade e aplicação do método. Os critérios recomendados para adaptação de um método para análise de traços são definidos a seguir (BRITO et al., 2003).

A precisão indica a proximidade entre medidas efetuadas, sendo expressa através do coeficiente de variação (CV). Pode ser obtido através da análise de: (i) repetitividade: quando se avalia sequencialmente uma mesma amostra em diferentes preparações e com as mesmas condições analíticas (técnico, equipamento e procedimento); (ii) precisão intermediária: quando uma mesma amostra é analisada em dias diferentes ou por técnicos analistas diferentes; (iii) reprodutibilidade: feita em colaboração com outros laboratórios, permite avaliar a proximidade entre os resultados quando se altera, ao menos, o técnico e o equipamento, sendo esta exigida para adoção do método como referência (RIBANI et al., 2004).

A exatidão representa a conformidade entre o valor encontrado utilizando o método analítico e o valor real. Pode ser obtido utilizando-se quatro diferentes abordagens que variam de acordo com o acesso a: (i) material de referência certificado; (ii) método de referência; (iii) matriz isenta do padrão; (iv) apenas matriz não isenta (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser detectada, porém sem ser quantificada por um determinado método. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão por um determinado método. Podem ser estimados de diferentes formas: (i) pela avaliação da relação entre sinal e ruído do cromatograma; (ii) avaliação dos parâmetros da curva de calibração; (iii) processos estatísticos (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

A seletividade é a capacidade do método em detectar as substâncias de interesse em meio contendo os diferentes componentes da matriz, podendo ser obtido utilizando-se três diferentes abordagens que variam de acordo com o acesso a: (i) matriz isenta do padrão; (ii) detectores avançados, como o espectrômetro de massa ou o arranjo de diodos (iii) apenas matriz não isenta (BRITO et al., 2003).

Diferentes faixas de variação para os critérios precisão e exatidão podem ser aceitas, sendo que esta aceitação foi associada à concentração das substâncias de interesse. A Tabela 2 exemplifica os coeficientes de variação e de recuperação admissíveis para algumas faixas de concentração do analito (BRITO et al., 2003).

Tabela 2 - Valores aceitáveis para a precisão e exatidão de acordo com a concentração do analitos.

Concentração do analito		CV (%)	Recuperação (%)
<0,001	(g L ⁻¹)	5,6	95-105
<10 ⁻⁶	(mg L ⁻¹)	16	80-110
<10 ⁻⁹	(µg L ⁻¹)	45	40-120

Adaptado de Brito et al., 2003.

2.8. Considerações finais

Os hormônios estrogênicos naturais, E1, E2 e E3, e o artificial, EE2, têm sido determinados em amostras de esgoto bruto em concentrações possíveis de causar perturbação endócrina.

As ETEs reduzem a concentração destes hormônios, entretanto com eficiências de remoções diferenciadas, até mesmo quando o mesmo tipo de tratamento é utilizado como etapa secundária, como o sistema de lodos ativados.

Os diferentes níveis de remoção têm sido associados a algumas características do sistema de lodos ativados, como: longo tempo de detenção hidráulica, elevada idade de lodo, baixa carga orgânica de alimentação e eficiência de remoção de nitrogênio.

Nos esgotos e efluentes, os hormônios são determinados na faixa de ng L⁻¹, o que exige prévio preparo da amostra antes da quantificação por cromatografia. Além de concentrar os hormônios, a extração em fase sólida (EFS) também reduz a presença de contaminantes provenientes da matriz que poderiam interferir na quantificação.

Alterações e adaptações de métodos de preparo e quantificação de amostras demandam a validação, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

Desta maneira, a presença e a remoção dos hormônios estrogênicos foram estudadas em uma ETE com sistemas secundário por lodo ativado após validação do método de preparo das amostras e de quantificação dos hormônios. Ademais, a ETE foi caracterizada por análises químicas e biológicas nos parâmetros relacionadas a melhores eficiências de remoção.

3 OBJETIVOS

3.1.Geral

Investigar a presença e a remoção dos hormônios estrogênicos estrona (E1), 17- β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17- α -etinilestradiol (EE2) em uma estação de tratamento de esgoto por lodos ativados, além de caracterizar a operação desta ETE.

3.2.Específicos

Identificar as estações de tratamento de esgoto instaladas na região Paulista do Vale do Paraíba para selecionar a ETE avaliada neste estudo.

Caracterizar o sistema de tratamento de esgoto sanitário selecionado por meio de análises físicas, químicas e biológicas e de dados técnicos e operacionais.

Adaptar e validar o método obtido para o preparo e a quantificação dos hormônios estrogênicos, utilizando cromatografia líquida acoplada a detector UV-Visível.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pesquisa das estações de tratamento de esgotos (ETE) da região e seleção da ETE de estudo

As ETEs instaladas na região Paulista da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul foram pesquisadas por meio de buscas na internet e contatos telefônicos com a finalidade de levantar os processos de tratamento de esgoto doméstico implantados na região e os tipos de tratamento secundários adotados.

Algumas ETEs foram visitadas para validação das informações levantadas anteriormente, quando autorizado pela empresa gestora.

Foi verificado que o sistema de lodos ativados é a forma de tratamento de esgoto mais adotada nos municípios da região Paulista da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul. Pelo fato da ETE instalada no próprio Campus I da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP) operar de forma regular com uso deste sistema, a estação foi selecionada para este estudo.

4.2. Pontos de coleta

Foram coletados, aproximadamente, 3 litros de amostras nos seguintes pontos em cada coleta:

- a. Esgoto bruto – na tubulação de enchimento do tanque de aeração 1;
- b. Efluente do tratamento secundário – na tubulação de descarte;
- c. Líquor (lodo aeróbio e esgoto em tratamento) – coletado diretamente do tanque aerado.

4.3. Coleta de amostras

O volume e a qualidade do esgoto tratado na ETE da EEL variam bastante durante o período letivo por influência da circulação de alunos. Desta maneira, procurou-se realizar a amostragem em diferentes etapas do período letivo, sendo 5 em período de férias (julho/2015) e 3 em período de aula (junho e agosto de 2015).

As coletas e a preservação das amostras foram realizadas de acordo com o “Guia nacional de coleta e preservação de amostras” (CETESB, 2011).

4.4. Caracterização do sistema de tratamento de esgoto

Foram levantados dados em campo sobre os equipamentos (número e capacidade), fluxo de tratamento, vazão média diária e programação dos tempos de operação.

Foram realizadas análises físicas, químicas e biológicas nas amostras coletadas para caracterização e avaliação do desempenho da estação.

Os parâmetros avaliados foram: pH, temperatura, condutividade, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldhal (NTK), fósforo total, identificação da microfauna de lodos aeróbios e quantificação dos ânions nitrito, nitrato e fosfato.

Para isto foram utilizados, os métodos brevemente descritos a seguir.

4.5.1. pH, temperatura e condutividade

Os valores de pH e temperatura das amostras foram determinados pela medida direta utilizando sonda multiparâmetro HANNA modelo HI 9811-5.

4.5.2. Demanda química de oxigênio (DQO)

Na determinação da DQO foi utilizado o método 5220 D. Closed Reflux Colorimetric adaptado do Standard methods for the examination of water and wastewater analysis (APHA, 1998).

4.5.3. Nitrogênio total Kjeldhal (NTK)

A quantificação do nitrogênio total Kjeldahl seguiu o método 4500- N_{org} C. Semi-micro-Kjeldahl descrito no Standard methods for the examination of water and wastewater analysis (APHA, 1998).

4.5.4. Fósforo total (FT)

A determinação de fósforo total foi realizada conforme o método 4500- P E. Ascorbic acid descrito no Standard methods for the examination of water and wastewater analysis (APHA, 1998).

4.5.5. Identificação e quantificação da microfauna de lodos aeróbios

A microscopia de lodo foi adaptada a partir de Jenkins, Richard e Daigger (1993) e de Madoni (1994) para observar e quantificar a microfauna presente no lodo aeróbio conforme descrito a seguir.

Foram tomadas pequenas amostras do Líquor (10 mL) em região de mistura eficiente no tanque de aeração e armazenadas sob refrigeração em frascos com o dobro do volume da amostra por no máximo 24 horas, porém antes de cada avaliação, a amostra foi retirada da refrigeração para que fosse analisada à temperatura ambiente.

Com auxílio de pipeta Pasteur limpa e seca, uma gota de cada amostra homogeneizada foi colocada na Câmara de Sedgewick-Rafter que possuiu volume determinado de 1 mL.

A avaliação microscópica foi feita com uso de lente de aumento de 100X recomendada para a observação, contagem e diferenciação dos diferentes protozoários e metazoários.

A identificação de algumas espécies de interesse foi possível devido à utilização de referências bibliográficas, como o anexo “Microfauna mais frequente” da Cetesb (1997) e do livro “The handbook of water and wastewater microbiology” (MADONI, 2003).

4.5.6. Determinação de ânions

As análises de ânions (NO_2^- , NO_3^- e PO_4^{3-}) foram realizadas em cromatógrafo de íons com condições conforme especificado na Tabela 3.

As amostras passaram por filtração a vácuo em filtros de 1,2 μm e 0,70 μm logo após a coleta e filtração a 0,45 μm previamente à injeção no cromatógrafo.

Tabela 3 - Condições cromatográficas para análise de ânions

Equipamento	Cromatógrafo de Íons Professional IC 850 Metrohm com detector Professional UV-VIS 887
Coluna	Metrosep A Supp 7 - 250/4.0
Fase Móvel	Bicarbonato de sódio 3,6 mmol L ⁻¹ Fluxo de 0,700 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 μL
Deteção	Condutividade

Fonte: Própria autora.

4.5. Determinação dos hormônios estrogênicos

4.5.1. Preparo das amostras e frações líquidas

As amostras líquidas foram submetidas à extração em fase sólida (EFS) em método adaptado de Liz, Nagata e Peralta-Zamora (2012), descrito a seguir.

Primeiramente, 1000 ou 750 ml da amostra foram pré-tratados por filtração em filtro de fibra de vidro (1,2 e 0,70 μm) para remoção de particulados, sendo estocadas sob refrigeração até o momento da extração, por não mais que 24h. O maior volume foi adotado para esgoto tratado, onde se esperava menor concentração dos hormônios estudados e o menor volume adotado para o esgoto bruto.

Antes da extração, as amostras foram retiradas da geladeira até atingirem a temperatura ambiente, quando tiveram o pH ajustado para 3,0.

O cartucho com fase estacionária C18 também foi preparado previamente à aplicação da amostra. Para isto, o cartucho foi colocado em manifold ligado a vácuo para condicionamento com acetonitrila e metanol. A seguir, o cartucho foi equilibrado com água deionizada a pH 3,0 criando um ambiente no cartucho similar ao da amostra, o que evita alterações nas condições de extração ao longo do processo.

Após estas etapas de preparação do cartucho e da amostra, iniciou-se a aplicação da amostra no cartucho com aplicação de vácuo.

Ao fim da extração de todo o volume da amostra, foi feita a clarificação com 10 mL de solução a 10 % de metanol em água deionizada para remoção de interferentes que poderiam ser retidos juntamente com os analitos.

Posteriormente, o cartucho foi seco por 10 minutos a vácuo, embrulhado em papel alumínio e guardado sob refrigeração.

A eluição se deu pela aplicação de 4 mL de acetonitrila ao cartucho colocado no manifold com colocação de vial limpo para a coleta do eluído. A eluição ocorreu no dia da análise cromatográfica.

4.5.2. Quantificação dos hormônios

A quantificação dos hormônios estrogênicos estrona (E1), 17- β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17- α -etinilestradiol (EE2) foi feita por cromatografia líquida acoplada a detector UV, conforme condições especificadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de análise dos hormônios

Equipamento	Cromatógrafo Profissional IC 850 Metrohm com detector Profissional UV-VIS 887
Coluna	Coluna C18 (Prontosil 120-5-C18-AQ-150/4.0 mm) 120 MPa (pressão máxima) 5 μm (tamanho das partículas) 150/4.0 mm (altura e largura) 30°C (temperatura do forno para a separação)
Fase Móvel	50 % Água/ 50 % Acetonitrila Fluxo de 1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	90 μL
Deteção	230 nm

Fonte: Própria autora.

Devido à baixa seletividade da detecção por UV, a quantificação dos hormônios foi feita pelo método de adição de padrão. Por este método, cada amostra foi eluída e fracionada em alíquotas que foram adicionadas de uma quantidade conhecida dos padrões dos analitos de interesse. Após análise cromatográfica, uma curva da concentração adicionada versus a área foi construída e a concentração do eluato foi estimada a partir da curva de regressão linear (BRITO, 2003; RIBANI, 2004).

4.5.3. Preparo das soluções

As soluções estoques (1000 mg L⁻¹) de cada um dos hormônios, foram preparadas pela pesagem dos padrões em balança analítica, dissolução em acetonitrila (99,9 %) e posterior avolumamento para 25,00 mL utilizando balões volumétricos. Estes padrões foram armazenados refrigerados (4° C) ao abrigo da luz.

A partir das soluções estoques, a cada dia de análise, foi preparada uma solução padrão de 10 mg L⁻¹ contendo os 4 hormônios de estudo. Esta solução padrão foi preparada com o uso de pipetador automático e avolumamento com acetonitrila (99,9 %) em balão volumétrico de 10,00 mL.

4.6. Adaptação e validação da metodologia analítica

O desenvolvimento do método analítico foi feito a partir de Chaves (2015), desenvolvido e validado no mesmo equipamento que seria usado neste estudo. As

alterações foram necessárias visto que o método original apresentava uma assimetria no pico do estriol (E3), tecnicamente denominada “ombro”, ocasionando erro no momento de integração para obtenção da área. Esta assimetria e o erro na integração podem ser visualizados na Figura 1.

Figura 1 - Cromatograma dos hormônios E1, E2, E3 e EE2 a 10 mg L^{-1} de acordo com o método de Chaves (2015).

Fonte: Arquivo pessoal.

A fim de melhorar a simetria para o pico referente ao E3 foram feitas variações na temperatura da coluna, composição e gradiente da fase móvel.

Após obtenção da simetria necessária, o método modificado para quantificação e preparo das amostras foi validado pelo uso dos critérios descritos a seguir.

4.6.1. Exatidão por teste de recuperação

Nove amostras foram preparadas em 3 níveis diferentes de concentração, 36, 120 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, pela adição de solução estoque dos hormônios (E1, E2, E3 e EE2) a água de torneira utilizando micropipetador automático. Deixou-se agir por 12h e foram filtradas em filtro $0,7 \mu\text{m}$ de fibra de vidro. As amostras tiveram o pH corrigido para 3 com uso de solução de HCl 1M e foram submetidos à extração em cartuchos C18 condicionados.

Após a extração do volume de cada amostra, os cartuchos passaram por clarificação com solução de metanol 1:10, foram secos a vácuo por 10 minutos, embrulhados em papel alumínio para que ficassem armazenados sob refrigeração até a eluição.

Cada cartucho foi eluído com 4 mL de acetonitrila e o eluato recolhido em balão volumétrico de 5,00 mL para obtenção de volume conhecido de amostra. Antes da injeção, as amostras foram filtradas a $0,45 \mu\text{m}$ com uso de seringa de vidro.

Enquanto foi feita a eluição das amostras, foram construídas as curvas de calibração para os hormônios. Para isto foram preparadas 5 soluções, com concentrações variando de 1 a 6 mg L⁻¹, pela adição de volumes determinados das soluções estoque dos hormônios à acetonitrila em balões volumétricos de 10,00 mL. Estes padrões foram injetados antes das amostras e as áreas obtidas foram utilizadas para a construção das curvas de calibração de cada hormônio.

As amostras eluídas foram injetadas aleatoriamente no cromatógrafo nas condições descritas na Tabela 4 para obtenção das concentrações no eluato.

As concentrações obtidas foram utilizadas para a determinação das concentrações nas amostras preparadas em água de torneira e estas foram divididas pelos valores reais (preparado) para obtenção dos percentuais de recuperação.

4.6.2. Precisão

A precisão foi obtida pelos mesmos ensaios utilizados na determinação da exatidão, porém com uma avaliação diferente.

Neste caso, o coeficiente de variação foi calculado a partir das equações 1 e 2 abaixo.

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

$$CV(\%) = \frac{s}{x} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Na qual: x é a média das concentrações obtidas, x_i são as diferentes concentrações obtidas e n o número de amostras.

4.6.3. Limites de detecção e de quantificação

Uma amostra a 10 mg L⁻¹ dos hormônios foi preparada pela diluição de 1 mL de solução estoque de hormônios em acetonitrila em balão volumétrico de 10,00 mL.

Esta amostra foi injetada no cromatógrafo nas condições apresentadas na Tabela 4 para medição da relação sinal/ruído de cada componente (hormônios de interesse).

A partir do valor obtido, estimou-se a concentração necessária para obter a relação 10:1. Foi feita a diluição necessária e uma nova injeção.

A estimativa da concentração, preparação de diluição e nova injeção foram repetidas até que se alcançasse a relação 10:1, que indicou o limite de quantificação.

Após esta definição, foram feitas novas estimativas de concentração, preparação de diluição e nova injeção até que se alcançasse a relação 3:1, que estabeleceu o limite de detecção.

4.6.4. Seletividade

4.6.4.1. Curva padrão com pré adição dos hormônios nas amostras

O estudo da seletividade do método cromatográfico com a matriz (esgoto) foi primeiramente realizado pela abordagem de curva padrão. Para isto, foram preparadas 12 amostras, sendo 6 em água e 6 em esgoto, com 6 diferentes concentrações dos hormônios.

As amostras foram preparadas, extraídas em cartucho C18 e eluídas conforme descrito no item 4.5.1.

Após eluídas, os eluatos foram secos por fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspensas pela adição de 1 mL de acetonitrila utilizando micropipetador digital, filtradas e injetadas no cromatógrafo para quantificação usando as condições cromatográficas listadas na Tabela 4.

Os resultados obtidos foram utilizados para cálculo das concentrações nas amostras preparadas. Finalmente, estas concentrações foram utilizadas para a construção das duas curvas, uma do padrão em água e outra do padrão em esgoto.

Foi feita a regressão linear das curvas e comparados os coeficientes angulares obtidos que não deveriam diferir em mais que 10 %.

4.6.4.2. Curva padrão com pós adição dos hormônios ao eluato

Nesta abordagem, as amostras foram preparadas, extraídas e eluídas para, então, o eluato ser dopado com diferentes concentrações dos hormônios, o que evitaria perdas dos hormônios adicionados devido à etapa de extração.

Para esta avaliação, 4 litros de efluente foi filtrado a vácuo em filtro de fibra de vidro de 0,7µm e o pH foi corrigido para 3,0. A fim de manter a uniformidade das amostras, estas só foram divididas em 8 alíquotas de 500 mL no momento da extração.

A extração e eluição foram feitas de acordo como descrito no item 4.5.1. com o eluato sendo recolhido em balões volumétricos de 5,00 mL, adição da solução padrão para a fortificação utilizando micropipetador digital e avolumamento com acetonitrila.

As amostras foram injetadas no cromatógrafo para obtenção das áreas dos picos e uma curva de concentração versus área foi construída.

Foi feita a regressão linear da curva obtida e o coeficiente angular calculado foi comparado ao coeficiente angular da curva padrão. Estes não deveriam diferir em mais que 10 % (RIBANI et al., 2004).

4.6.5. Linearidade

A linearidade foi avaliada na faixa de concentração esperada para os eluatos a serem obtidos. Neste caso, entre o limite de quantificação (LQ) de cada hormônio e 10 mg L^{-1} .

Foram preparados 100 mL de uma solução padrão a 10 mg L^{-1} dos quatro hormônios em estudo, a partir de soluções estoques de cada hormônio a 1000 mg L^{-1} . Utilizando a solução 10 mg L^{-1} , foram feitas diluições fracionadas para obtenção de 10 mL de amostras nas concentrações de 0,250; 0,520; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 mg L^{-1} .

As amostras foram injetadas em triplicata no cromatógrafo seguindo a concentração crescente e as respostas obtidas (áreas) foram plotadas versus a concentração (mg L^{-1}) com a utilização do Excel.

A partir dos gráficos obtidos, foi feita a regressão linear para obtenção dos coeficientes de regressão linear (R). A linearidade é comprovada quando o coeficiente (R) é estatisticamente diferente de zero.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pesquisa das Estações de tratamento de esgoto na região

Foram levantadas 38 ETEs em operação na região Paulista da bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul. Foram verificados que as ETEs são administradas por 4 diferentes empresas que possuem a concessão para a prestação deste serviço nos diferentes municípios Paulistas do Vale do Paraíba.

Foi constatado que o tratamento secundário por lodos ativados é o mais frequentemente adotado pelos diferentes municípios. Este sistema não é exatamente uniforme, visto que as plantas apresentam variações quanto a dimensões dos tanques, capacidade de tratamento, formas de aeração e regime de operação.

Sendo assim, foi priorizada para este estudo uma ETE com tratamento secundário por lodos ativados localizada na EEL/USP.

5.2. Caracterização do sistema de tratamento de esgoto

Diariamente, são gerados 85 m^3 de esgoto (informação verbal)² com 16,50 kg de DQO, aproximadamente, no Campus I da EEL/USP. Todo este esgoto sanitário é tratado em uma ETE com sistema de lodos ativados na configuração em batelada sequencial (SBR).

A eficiência média obtida de remoção de DQO (77 %) permite estimar que a ETE reduz, aproximadamente, 12,7 kg de matéria orgânica que seriam lançados diariamente no Ribeirão Limeira, afluente do Rio Paraíba do Sul.

Já no período de férias, com a redução do fluxo de alunos ao campus, a vazão média de esgoto gerado reduz para $40 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$ (informação verbal)³ e com isso, a quantidade de matéria orgânica removida se altera.

Inicialmente, a ETE foi configurada para tratamento de forma contínua, todavia o aumento no volume de esgotos gerados, devido ao aumento no número de alunos levou à necessidade de ampliação de sua capacidade. Esta adaptação foi feita pela adoção do sistema de batelada sequencial (SBR) com a utilização do decantador também como tanque

² Informação fornecida por Marcos Ramos em Lorena, em 2014

³ Informação fornecida por Marcos Ramos em Lorena, em 2014

de aeração (Aeração 2) e automação do sistema para a operação em batelada com aeração intermitente.

O esquema de funcionamento atual da ETE e volumes dos tanques são apresentados na Figura 2, onde pode-se perceber as particularidades da ETE da EEL frente a outras ETEs com SBR implantado: (i) na ETE de estudo, os processos acontecem simultaneamente nos 2 tanques, dado que possui um tanque pulmão para o recebimento do esgoto enquanto o tratamento é realizado; (ii) a ETE não possui nenhum tratamento preliminar (peneira, caixas removedoras de areia e óleo) e nem tratamento primário (clarificador e flotador, por exemplo).

Figura 2 - Esquema de funcionamento da ETE da EEL/USP

Fonte: Arquivo pessoal e (informação verbal)⁴.

Durante o período de amostragem, a ETE operou em bateladas de 2 horas e 5 minutos abrangendo desde o enchimento até o descarte, conforme apresentado na Figura 3. Por 80 minutos de cada batelada, a aeração ocorreu de forma intermitente em ciclos de 5 minutos, sendo 50 % deste tempo ligada e 50 % desligada.

Figura 3 - Divisão do tempo de um ciclo de operação da ETE.

Fonte: Arquivo pessoal.

⁴ Informação fornecida por Marcos Ramos em Lorena, em 2014.

A caracterização do esgoto foi baseada nos resultados das análises físicas e químicas realizadas. Os resultados analíticos são apresentados na Tabela 5 ao fim desta seção.

As flutuações dos parâmetros condutividade, pH, DQO, DBO, NTK, fósforo total (FT), nitrito, nitrato e fosfato no esgoto bruto devem ser consequência das particularidades do esgoto do campus, que além dos dejetos domésticos usuais (oriundos de sanitários e refeitório), também recebe o efluente dos laboratórios de pesquisa e ensino.

O esgoto bruto recebido na ETE ao longo deste estudo teve menor concentração de matéria orgânica (123 ± 5 mg DBO L⁻¹ e 194 ± 92 mg DQO L⁻¹) comparados ao esgoto sanitário de diversos municípios brasileiros da região Sudeste, estudados por Oliveira e Sperling (2011) (339 mg DBO L⁻¹ e 639 mg DQO L⁻¹). Outros estudos de caracterização realizados no Brasil e no mundo, relatam valores entre 225 e 268 mg DBO L⁻¹ e entre 194 e 483 mg DQO L⁻¹ (COLMENAREJO et al., 2006; DIAS et al., 2005; DUPONT; LOBO, 2012; LAPA, 2003; SANTOS et al., 2011).

Já a concentração de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) ($54,7 \pm 29,8$ mg NTK L⁻¹) foi maior do que as reportadas por Dias et al. (2005), no esgoto bruto de uma ETE localizada em Minas Gerais ($26,0$ mg NTK L⁻¹), e por Oliveira e Sperling (2011), na avaliação do esgoto bruto de 166 ETEs da região sudeste do Brasil ($49,9$ mg NTK L⁻¹). Por outro lado, a concentração de NTK do corrente trabalho, provavelmente, foi menor do que a encontrada por Dupont e Lobo (2012), para o esgoto de Universidade (UNISC/RS), $50,8 \pm 29,9$ mg N L⁻¹, visto que este último avaliou nitrogênio amoniacal que é um dos componentes quantificados na análise de NTK.

A concentração de fósforo total ($3,1 \pm 1,9$ mg P L⁻¹) esteve dentro da faixa dos resultados encontrados na literatura que reportam a concentração deste elemento, entre 2,9 e 3,9 mg P L⁻¹ (OLIVEIRA; SPERLING, 2011; SANTOS et al., 2011; DUPONT; LOBO, 2012).

A elevada concentração apenas de NTK em relação aos outros parâmetros menores (DQO, DBO e fósforo total), pode ser devida à alta predominância de urina e seus componentes nitrogenados no esgoto da escola, visto que o campus não possui dormitórios, poucos chuveiros e o refeitório não ser utilizado para o preparo dos alimentos, fontes de resíduos que o faz diferir do esgoto domiciliar recebidos por ETEs municipais.

Quanto à operação da ETE, os resultados de pH, condutividade e temperatura dos esgotos e efluentes apresentaram, conforme esperado, pequenas modificações pelo tratamento secundário e não acrescentam informações a respeito do desempenho da ETE.

Já as diferentes concentrações de DQO, NTK e fósforo total (FT) entre as amostras de esgoto e efluente são decorrentes do desempenho da ETE e são discutidas a seguir. Os resultados analíticos apresentados na Tabela 5 foram utilizados nas avaliações.

Foram obtidas as eficiências médias de remoção de DQO (77 %), NTK (-4 %) e de fósforo total (43 %). Estes desempenhos são corroborados pelas avaliações realizadas na microfauna do lodo que levaram a índices bióticos do lodo (IBL) 5 e 6. Os índices obtidos são devidos, principalmente, a observação de amebas e ciliados fixos em todas as amostras, entretanto sem caracterizar dominância destes organismos. Tais índices foram relacionados por Madoni (1994) à depuração biológica insuficiente e a desempenho de bom a médio.

De acordo com Oliveira e Sperling (2011), uma ETE com tratamento secundário por lodos ativados proporcionaria eficiências de remoção de DQO entre 80 e 93 %, abaixo de 60 % de NTK e menor que 35 % de fósforo. Neste mesmo estudo, os autores encontraram faixas de eficiência entre 62 e 93 % de remoção de DQO, 26 a 60 % de NTK e entre 20 e 50 % de fósforo total para 13 ETEs avaliadas na região sudeste do Brasil com o mesmo tipo de tratamento secundário, lodos ativados.

Apesar da ETE da EEL ter passado por modificações para aumento da capacidade de tratamento, esta ETE ainda exibe desempenho similar a outros sistemas por lodos ativados, exceto pela remoção de NTK.

Os fatores que podem ter levado à não remoção de NTK seriam: (i) baixo tempo de retenção de sólidos: que não permite o desenvolvimento de micro-organismos nitrificantes; (ii) aeração insatisfatória para a ocorrência da nitrificação; (iii) fase anóxica (aeração desligada) insuficiente para a etapa de desnitrificação. Tais controles não estão implantados na ETE e são essenciais para sucesso da remoção deste composto (EKAMA, 2010; EUSEBI et al., 2008; INSEL et al., 2006).

Tabela 5 - Resultados das análises físicas e químicas nas amostras de esgoto bruto e efluente.

Amostra				Temperatura	Condutividade	pH	DQO	NTK	Fósforo	N - NO ₂	N-NO ₃	P- PO ₄
				(°C)	(uS/cm)		mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
1	26/06/2015	bruto	EB 1	21,0	1130	7,5	284 ± 2	113 ± 29	7,6 ± 1,8	0,382	1,583	66,192
		tratado	ET 1	21,1	1270	7,0	99 ± 1	110 ± 26	0,1 ± 0,0	0,242	1,707	0,677
2	16/07/2015	bruto	EB 1	21,8	400	6,8	110 ± 10	21 ± 0	2,2 ± 0,2	0,273	0,619	24,880
		tratado	ET 1	22,6	390	6,3	37 ± 3	20 ± 1	2,6 ± 0,2	0,293	13,387	25,963
3	16/07/2015	bruto	EB 2	21,8	380	6,7	108 ± 14	23 ± 1	2,0 ± 0,0	0,281	0,451	17,813
		tratado	ET 2	23,7	390	6,5	28 ± 8	22 ± 1	1,8 ± 0,0	0,297	13,170	22,122
4	29/07/2015	bruto	EB 1	20,5	330	6,6	318 ± 34	53 ± 0	2,1 ± 1,0	0,280	0,474	0,000
		tratado	ET 1	21,2	380	6,3	16 ± 2	13 ± 0	1,2 ± 0,1	0,160	7,418	14,151
5	29/07/2015	bruto	EB 2	21,2	380	6,3	105 ± 5	44 ± 0	2,6 ± 0,6	0,290	0,266	31,265
		tratado	ET 2	21,8	360	6,3	27 ± 5	41 ± 0	1,1 ± 0,01	0,139	3,746	8,000
6	29/07/2015	bruto	EB 3	21,7	470	6,7	298 ± 11	45 ± 0	2,4 ± 0,2	0,304	0,145	25,542
		tratado	ET 3	21,6	480	6,7	18 ± 8	23 ± 0	0,9 ± 0,0	0,307	0,860	10,050
7	19/08/2015	bruto	EB 1	24,5	810	8,1	146 ± 5	69 ± 0	2,7 ± 0,1	0,109	201,393	0,000
		tratado	ET 1	25,2	840	7,1	48 ± 12	52 ± 0	1,5 ± 0,0	0,109	212,642	0,000
8	19/08/2015	bruto	EB 2	25,2	870	7,8	181 ± 20	70 ± 0	3,0 ± 0,0	0,110	220,238	0,000
		tratado	ET 2	25,0	840	7,4	41 ± 10	56 ± 0	1,8 ± 0,0	0,000	301,755	0,000

Legenda: DQO – Demanda química de oxigênio; NTK – nitrogênio total Kjeldahl; N - NO₂ – nitrogênio em nitrito; N - NO₃ – nitrogênio em nitrato; P-PO₄ – Fósforo em fosfato.

Fonte: Arquivo pessoal

5.3. Adaptação e validação do método analítico

Variações na temperatura da coluna, composição e gradiente da fase móvel foram testadas a fim de eliminar a assimetria no pico (de eluição) do hormônio estriol (E3). O fator de assimetria (A_s) próximo a 1,00, ideal segundo Snyder, Kirkland e Dolan (2009), foi obtido utilizando a fase móvel isocrática Água Milli-Q/Acetonitrila na proporção 50:50. A melhora na simetria no pico do E3 pode ser verificada comparando as Figuras 4.A e 4.B.

A modificação não impactou no fator de assimetria (A_s) dos demais analitos de interesse, obtendo-se valores também próximos a 1,00.

A resolução crítica do método, 1,4, ocorre entre os analitos EE2 e E1 (últimos picos da figura 4.B.). Snyder, Kirkland e Dolan (2009) recomendam valores superiores a 1,5, entretanto, admitem valores menores se os picos envolvidos apresentarem tamanhos semelhantes e fatores de assimetria próximos a 1,00, ambos os critérios atendidos neste método.

Figura 4 - Cromatogramas dos hormônios E1, E2, E3 e EE2 obtidos pelos dois métodos: A. cromatograma com método Chaves (2015); B. cromatograma após modificações.

Fonte: Arquivo pessoal.

O método desenvolvido por Chaves (2015), também, apresentava baixas respostas em área e altura dos picos, o que gerava elevados limites de quantificação e detecção. Estes limites foram aprimorados com a detecção a 230 nm, utilizada por Xiao et al. (2011), em equipamento similar ao disponível para este estudo. A comparação entre os resultados obtidos para os dois comprimentos de onda são apresentados na Tabela 6 que mostra a melhoria obtida.

Além dos ganhos em resolução e em respostas, no método modificado foi reduzido o tempo de corrida de 15 para 10 minutos gerando, ganho de produtividade, além da redução no consumo de solvente orgânico, um dos objetivos da química verde, em que cresce a preocupação com os impactos ambientais dos processos químicos (LENARDÃO, 2013).

Tabela 6 - Comparativo entre as áreas dos picos obtidos a partir da detecção nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm para uma mesma solução dos hormônios a 10 mg L⁻¹.

Hormônio	Área (mAU x min)	
	230 nm	280 nm
E2	51,971	2,234
EE2	46,393	18,911
E1	53,381	22,177

Fonte: Arquivo pessoal.

Com a definição dos parâmetros cromatográficos, prosseguiu-se para a validação do método cromatográfico, necessário para garantia da qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

5.3.1. Exatidão

A exatidão em todo o processo de análise foi avaliada pela recuperação. Para isto, amostras fortificadas em 3 diferentes níveis de concentração com 3 repetições foram submetidas a todo processo de preparação, extração, eluição e análise cromatográfica.

As concentrações obtidas foram comparadas às concentrações de preparo das amostras fortificadas, sendo obtidas as recuperações apresentadas na Tabela 7.

Dos quatro hormônios estudados, o hormônio estrona (E1) apresentou os melhores resultados de recuperação para os três níveis de concentração, o que pode ser verificado pela proximidade dos valores obtidos de 100 %, ou seja, da concentração da amostra preparada.

Tabela 7 - Resultados do ensaio de exatidão por recuperação em 3 diferentes níveis de fortificação com os hormônios E1, E2, E3 e EE2.

Hormônio	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
E1	36	98
	120	104
	200	105
E2	36	97
	120	116
	200	86
E3	36	45
	120	30
	200	23
EE2	36	66
	120	99
	200	103

Fonte: Arquivo pessoal.

O hormônio 17- β -estradiol (E2) apresentou excelente recuperação (97 %) no menor nível de concentração (36 $\mu\text{g L}^{-1}$). Nos níveis maiores a exatidão foi inferior, porém ainda dentro do recomendado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para compostos minoritários e na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de recuperação para esta faixa devem estar entre 40 e 120 % (BRITO, 2003). Além disso, as concentrações de E2 em esgoto e efluente estão na faixa de menor fortificação, que apresentou a melhor recuperação.

Comportamento diferente foi encontrado para o hormônio 17- α -etinilestradiol (EE2), que apresentou melhor exatidão (99 e 103 %) nos 2 maiores níveis de fortificação, porém com o menor resultado para recuperação (66 %), ainda dentro dos limites recomendados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para compostos minoritários e na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRITO, 2003).

O hormônio estriol (E3) apresentou o pior resultado de exatidão, visto os menores valores de recuperação obtidos dentre os 4 hormônios avaliados, sendo que apenas o menor nível de fortificação ficou dentro dos limites recomendados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para compostos minoritários e na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRITO, 2003).

A baixa recuperação do estriol pode ser devido ao método de extração da amostra, principalmente devido à fase estacionária do cartucho utilizado neste estudo (C18).

Enquanto o C18, utilizado no cartucho de EFS, é um composto apolar, o hormônio estriol (E3) apresenta maior polaridade dentre os hormônios estudados. O Coeficiente de partição água/octanol (Log Kow) do E3 é 2,81, enquanto os outros hormônios possuem valores superiores a 3,40 e com isto, podem ter apresentado resultados de recuperações admissíveis utilizando C18. O E3, composto de maior polaridade, é portanto, menos retido pelo C18 (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

Cartuchos com fase estacionária de carbono grafitizado e poliméricas, como o poliestireno divinilbenzeno, têm apresentado retenções superiores a cartuchos com fase estacionária de C18 (JARDIM, 2010).

Yu, Wu e Chang (2013) relataram que os cartuchos contendo carbono grafitizado e poliestireno divinilbenzeno são os mais utilizados em extração em fase sólida. Os autores avaliaram a recuperação destes dois materiais para diversos micropoluentes, inclusive o hormônio estrona que apresentou recuperação superior a 90 % para os dois materiais.

Fonseca, Cardoso e Esteves (2013) obtiveram recuperações entre 100 e 116 % para os mesmos hormônios do corrente estudo com a utilização de cartucho com fase estacionária polimérica.

A quantidade de fase estacionária no cartucho (500 mg) pode ser outra possível causa para a menor recuperação, visto que no estudo de Kvanli et al. (2008) foi alcançada recuperação de 118 % do estriol quando utilizado cartucho com 2 mg de C18.

5.3.2. Precisão

A precisão do método, desde a preparação das amostras até a quantificação, foi estimada pelos coeficientes de variação das respostas obtidas para as triplicatas em 3 níveis de concentrações diferentes.

De acordo com Wood (1999), quanto menor o nível de concentração do composto na amostra, maior o coeficiente de variação (CV) aceitável. O CV admissível deve ser menor que o valor obtido a partir da equação de Horwitz (equação 3).

$$CV = 2^{(1-0,5*\log C)}$$

Equação 3

Onde C é a concentração do analito de interesse na amostra.

Os coeficientes de variação (CV) obtidos para os 4 hormônios nos 3 diferentes níveis e os coeficientes de variação admissíveis são apresentados na Tabela 8 e evidenciam a precisão do método utilizado pela proximidade entre as várias medidas efetuadas.

Tabela 8 - Precisão obtida para os hormônios E1, E2, E3 e EE2 nos 3 níveis de concentração

Fortificações ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Hormônio	Aceitável	Obtido
36	E1	26,4	0,24
	E2		8,48
	E3		1,56
	EE2		3,48
120	E1	22,0	1,57
	E2		5,57
	E3		6,53
	EE2		3,69
200	E1	20,4	1,03
	E2		0,17
	E3		3,69
	EE2		0,79

Fonte: Arquivo pessoal

Além de estarem dentro dos limites aceitáveis, os coeficientes de variação obtidos neste estudo, entre 0,17 e 8,48, também estão dentro da faixa de valores encontrados em outros trabalhos que foram utilizados processos de extração e equipamentos de cromatografia e detecção diversos conforme resumido na Tabela 9.

Tabela 9 - Faixa de CV obtidas em outros trabalhos consultados na literatura.

Trabalho	Cartucho utilizado	Cromatógrafo	Faixa de CV
Fonseca, Cardoso e Esteves (2013)	Strata-X 33	CLA -UV	0,05 - 1,5 %
Kuster et al. (2009)	LiChrolut RP-18	CG-MS	5 - 6 %
Sodré et al. (2010)	HLB Oasis	CLAE-MS/MS	0,1 - 28 %
Torres (2014)	HLB Oasis	CLAE-MS/MS	1 - 11 %
Xu et al. (2014)	Envi-18	CG-MS	0,6 - 13 %

Fonte: Arquivo pessoal

5.3.3. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir das relações sinal/ruído obtidas nos cromatogramas, sendo utilizada a relação 3:1 para definição do limite de detecção e de 10:1 para o limite de quantificação.

A consolidação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método modificado.

Hormônio	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
E1	0,25	0,52
E2	0,25	0,52
E3	0,06	0,25
EE2	0,25	0,52

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, os limites de detecção e quantificação foram aparentemente altos quando são comparados com resultados de trabalhos em que utilizaram detectores por espectrometria de massa, com limites na faixa de ng L⁻¹. Entretanto, os limites de detecção e quantificação obtidos no corrente estudo estão na mesma faixa de trabalhos em que, também, foram utilizados detector UV. Fonseca, Cardoso e Esteves (2013) estimaram os limites de detecção dos hormônios E1, E2, E3 e EE2 entre 89 e 450 µg L⁻¹, Xiao et al. (2013) estimaram valores entre 200 e 700 µg L⁻¹ para os hormônios E1, E2 e EE3.

5.3.4. Linearidade

Os ensaios demonstraram a capacidade do método de dar respostas (área) diretamente proporcionais às concentrações das substâncias estudadas para a faixa de concentração esperada (até 10 mg L⁻¹). Visto que os coeficientes de correlação das retas (R) obtidos e apresentados na Tabela 11 são superiores a 0,91, indicaram correlação fortíssima (BRITO, 2003).

Tabela 11 - Resultados da avaliação da linearidade do método modificado para os hormônios E1, E2, E3 e EE2.

	Faixa de linearidade	Equação da reta	R
E1	0,520 a 10 mg L ⁻¹	$y=0,705x + 0,009$	0,997
E2	0,520 a 10 mg L ⁻¹	$y=0,654x - 0,016$	0,995
E3	0,250 a 10 mg L ⁻¹	$y=0,653x - 0,158$	0,997
EE2	0,520 a 10 mg L ⁻¹	$y=0,632x - 0,004$	0,997

Legenda: R - coeficiente de correlação da reta

Fonte: Arquivo pessoal

5.3.5. Seletividade

5.3.3.1. Curva padrão com pré adição dos hormônios as amostras

Dois conjuntos de amostras foram fortificadas em diferentes concentrações, sendo um conjunto em água e outro em efluente. As amostras foram extraídas e eluídas conforme descrito no item 4.5.1 e analisadas por cromatografia de acordo com as condições descritas no item 4.5.2.

As áreas obtidas nos cromatogramas para os analitos de interesse (E1, E2, E3 e EE2) foram plotadas versus a concentração de fortificação para a obtenção de duas curvas por analito. Foi feita a regressão linear de cada curva e os coeficientes angulares obtidos na curva em água e efluente foram comparados. As curvas obtidas para o 17- α -etinilestradiol (EE2) ilustram a Figura 5 e exemplificam os resultados obtidos.

Figura 5 - Exemplo de curvas obtidas no estudo da seletividade com adição de padrão (EE2) antes da extração.

Fonte: Arquivo pessoal.

A relação entre os coeficientes não poderia diferir em mais que 10 % (RIBANI et al., 2004), porém os coeficientes diferiram entre 19 e 49 %, conforme apresentado na Tabela 12. Tal resultado demonstra que a matriz complexa do efluente pode interferir na quantificação dos hormônios.

Tabela 12 - Coeficientes angulares das retas obtidos pela extração de amostras fortificadas em matriz aquosa e efluente e a relação entre estes.

	Coeficientes Angulares das retas		
	Água	Efluente	Relação
E1	0,2885	0,4303	49 %
E2	0,2794	0,3810	36 %
E3	0,3387	0,2739	19 %
EE2	0,2967	0,3827	29 %

Fonte: Arquivo pessoal.

Além do efeito matriz, não se pode descartar a influência da recuperação nestes resultados obtidos, visto que as amostras fortificadas passaram por todo o processo de preparo de amostra, sujeitos a valores de recuperação considerados admissíveis, porém variáveis e com isto as respostas obtidas (áreas) estiveram aquém do esperado pela fortificação.

Por este motivo, foi utilizada outra abordagem de avaliação da seletividade que descartasse o impacto da recuperação nas curvas.

5.3.3.2. Curva padrão com adição de hormônios ao eluato

A fim de eliminar o efeito da recuperação nas curvas, amostras de efluente foram preparadas, extraídas e eluídas para, então, o eluato ser acrescido de diferentes concentrações dos hormônios de interesse.

As soluções obtidas foram analisadas por cromatografia de acordo com as condições descritas no item 4.5.2, e as áreas obtidas nos cromatogramas para os analitos de interesse (E1, E2, E3 e EE2) foram plotadas versus a concentração de fortificação para a obtenção das curvas. Foi feita a regressão linear de cada curva e os coeficientes angulares obtidos nestas curvas foram comparados com as curvas padrões preparadas em acetonitrila. A Figura 6 exemplifica um par de curvas obtidas quando o EE2 foi avaliado.

Figura 6 - Exemplo de curvas obtidas no estudo da seletividade por fortificação dos eluatos para o EE2.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados obtidos para os hormônios E1, E2 e EE2 são apresentados na Tabela 13 e, como pode ser verificado, não foi possível novamente descartar o efeito da matriz (efluente) sobre os picos obtidos para os hormônios, visto que as relações obtidas são maiores que 10 %. Para o E3, a curva não pode ser construída, pois nenhum pico pode ser identificado e integrado no tempo de eluição deste composto.

Tabela 13 - Coeficientes angulares das retas obtidos pela fortificação dos eluatos e por amostras padrão preparadas em acetonitrila e a relação entre estes.

	Coeficientes Angulares das retas		
	ACN	Efluente	Relação
E1	0,2667	0,3917	-47 %
E2	0,2215	0,4497	-103 %
E3	Não detectado		
EE2	0,1167	0,2157	-85 %

Legenda: ACN – acetonitrila.

Fonte: Arquivo pessoal.

Esta dificuldade era esperada, uma vez que o esgoto bruto e o efluente tratado são formados por diferentes compostos orgânicos e inorgânicos dispersos em matrizes aquosas que podem ser extraídos juntamente com os analitos de interesse e não removidos satisfatoriamente durante a operação de clarificação. Isto torna a determinação de micropoluentes em matrizes ambientais desafiadora até mesmo com o uso de detectores mais sofisticados, como o espectrômetro de massa (JAFARI; ABASABAD; ALEHZADEH; 2009; ZHOU et al. 2009).

Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000) propuseram um método de predição das quantidades dos hormônios no esgoto bruto como uma alternativa a quantificá-los em matrizes complexas, entre outras vantagens. Neste estudo, comparando os valores preditos com as quantidades encontradas, dispersões de até 400 % foram encontradas. Estas podem ser atribuídas à falha dos dados populacionais usados na predição, na amostragem ou como consequência do efeito matriz.

A fim de reduzir o impacto da matriz sobre a determinação dos hormônios estrogênicos, Zhou et al. (2009) avaliaram diferentes formas de clarificação do eluato por cromatografia com as fases móveis sílica gel e óxido de alumínio. O efeito matriz foi totalmente eliminado com o uso de óxido de alumínio na clarificação. A quantificação foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado espectrômetro de massa.

Koh et al. (2007) avaliaram o efeito das matrizes água, esgoto sedimentado e efluente tratado na seletividade dos analitos E1, E2, E3, EE2 e seus conjugados. Apesar do extenso procedimento de clarificação aplicado aos eluatos (cromatografia de permeação em gel e troca de ânions), fracionamento do eluato e detecção por espectrometria de massa, ainda não foi possível eliminar o efeito das matrizes esgoto sedimentado e efluente tratado sobre os picos dos compostos.

Xiao et al. (2013) propuseram a extração por coprecipitação assistida em ponto de nuvem de forma alternativa à extração em fase sólida e conseguiram excelentes resultados na seletividade e recuperação dos hormônios estrogênicos, além de reduzir o consumo de solventes orgânicos e o tempo de preparo de amostras.

No corrente trabalho, assim como no trabalho de Kang, Hing e Price (2007) de quantificação de diversos fitoestrogênios em amostras ambientais no qual não foi obtida seletividade suficiente mesmo com a utilização de cromatografia acoplada a espectrometria de massa, optou-se por quantificar os analitos de interesse por meio do método de adição de padrão. A Figura 7 ilustra uma das curvas construídas utilizando a adição de padrão para determinação dos hormônios nas amostras.

Esta abordagem tem a vantagem de contornar o efeito matriz em cada amostra analisada, com maior garantia do resultado do que se este efeito tivesse sido eliminado em uma única amostra, visto a variedade de composição encontrada para os diferentes macroconstituintes neste estudo.

Figura 7 - Exemplo de curva obtida através da adição de padrão em diferentes concentrações.

Fonte: Arquivo pessoal.

A utilização desta abordagem para contornar o efeito matriz permite que o método desenvolvido seja utilizado para a quantificação dos hormônios E1, E2, E3 e EE2, visto que o método adaptado atendeu aos outros critérios utilizados para a validação: exatidão, precisão e linearidade. Além disto, a adição de padrão após extração assegura concentrações maiores que os limites de quantificação e detecção no eluato. Na Tabela 14 são apresentados os resultados dos critérios de validação do método desenvolvido.

Ressaltando que a quantificação do hormônio estriol (E3) foi validada apenas para o menor nível de concentração, uma vez que foram obtidos resultados não admissíveis no teste de exatidão por recuperação para as demais concentrações.

Tabela 14 - Resultados obtidos na validação do método modificado

Hormônio	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	CV (%)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
E1	36	98	0,24	250	520
	120	104	1,57		
	200	105	1,03		
E2	36	97	8,48	250	520
	120	116	5,57		
	200	86	0,17		
E3	36	45	1,56	60	250
EE2	36	66	3,48	250	520
	120	99	3,69		
	200	103	0,79		

Fonte: Arquivo pessoal.

Legenda: CV - Coeficiente de variação; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação.

5.4. Determinação dos hormônios

5.4.1. Esgoto Bruto

Os 4 hormônios estudados foram detectados e quantificados em todas as amostras de esgoto bruto com exceção do estriol (E3), que não foi detectado em uma das amostras, devido à baixa recuperação no preparo da amostra. As concentrações médias detectadas foram: $5,148 \pm 2,747$, $7,434 \pm 4,356$, $5,200 \pm 3,331$ e $5,638 \pm 4,312 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios E1, E2, E3 e EE2, respectivamente.

As concentrações dos hormônios estrogênicos em ng L^{-1} são consideradas usuais, visto a grande quantidade de trabalhos que apresentam tais resultados nesta ordem, por exemplo: 27 ng L^{-1} de E1 e 15 ng L^{-1} de E2 foram as médias determinadas em esgoto bruto de ETE na Alemanha (TERNES; KRECKEL; MUELLER, 1999); $82,1 \text{ ng L}^{-1}$ de E1 e $25,5 \text{ ng L}^{-1}$ de E2 foram as médias encontradas para 11 diferentes ETEs da Europa Ocidental e Meridional e 2 dos Estados Unidos da América (USA) (JANEX-HABIBI et al., 2009); 15 ng L^{-1} de E1, 26 ng L^{-1} de E2, abaixo de 2 ng L^{-1} de E3 e abaixo de 5 ng L^{-1} de EE2 foram as médias dos hormônios determinadas em 5 ETEs descentralizadas do USA (STANFORD; WEINBERG, 2010); 370 ng L^{-1} de E1, 195 ng L^{-1} de E2, 170 ng L^{-1} de E3 e 136 ng L^{-1} de EE2 foram as médias encontrados no esgoto bruto de 9 ETEs da região central de Portugal (FONSECA; CARDOSO; ESTEVES, 2013); concentrações entre $69,3$ e 280 ng L^{-1} de E1 e entre $1,3$ e 30 ng L^{-1} de E2 foram determinadas em 5 ETEs da China (XU et al., 2014).

Foram encontrados poucos trabalhos similares realizados no Brasil, no entanto, nestes poucos trabalhos as concentrações determinadas estavam na ordem de ng L^{-1} . Ternes, Kreckel e Mueller (1999) encontraram 40 ng L^{-1} de E1 e 21 ng L^{-1} de E2 em amostra composta de esgoto bruto de ETE no município do Rio de Janeiro. Ferreira (2012) determinou a concentração de E2 em 2 ETEs, também, do Rio de Janeiro, encontrando valores abaixo de 6 ng L^{-1} . Já Pessoa et al. (2014) encontraram valores mais elevados no estudo realizado em 5 ETEs do estado do Ceará, sendo que as concentrações máximas e médias foram, respectivamente: 566 e 3050 ng L^{-1} de E1; 143 e 776 ng L^{-1} de E2; 421 e 3180 ng L^{-1} de EE2.

Xu et al. (2014) justificaram as elevadas concentrações dos estrogênios determinadas no trabalho realizado na China (2013), até 280 ng L^{-1} de E1 e até 30 ng L^{-1}

de E2, pela alta densidade populacional e o reduzido consumo de água das regiões atendidas pelas ETEs estudadas.

Avaliando a geração de efluentes como justificativa para a elevada concentração dos hormônios estrogênicos obtidos no presente trabalho e no trabalho de Pessoa et al. (2014), estima-se que cada frequentador do campus estudado gere 47 litros de esgoto por dia e 123 litros de esgoto são gerados por dia per capita no estado do Ceará. Já no estado do Rio de Janeiro, onde menores concentrações foram determinadas por Ternes, Kreckel e Mueller (1999) e Ferreira (2012), a geração diária de esgoto por dia per capita é 4 vezes maior do que o corrente estudo, 209 litros foram coletados em 2013 (BRASIL, 2014).

A maior participação da urina no esgoto bruto gerado no campus, dado a maior concentração de NTK no esgoto bruto do que no esgoto municipal, é outra particularidade das amostras estudadas que pode estar relacionada à maior concentração dos hormônios encontradas, uma vez que os hormônios são excretados principalmente por esta via.

Ruchiraset e Chinwetkitvanich¹ (2014) também encontraram os hormônios estrogênicos na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto bruto de 7 ETEs de Bangkok/Tailândia. Todavia, diferentemente do corrente trabalho, em que os 4 hormônios foram detectados em quase todas as amostras, a frequência de detecção dos hormônios variou bastante entre as amostras coletadas em diferentes épocas do ano (seca ou úmida). Em algumas amostras da temporada úmida não foi detectado nenhum hormônio ou a concentração foi bastante reduzida frente às amostras de temporadas secas.

Pessoa et al. (2014) sugerem que o E2 e o EE2 são convertidos a E1 durante o percurso até a ETE, por conseguinte não são frequentemente detectados ou são determinados em menores concentrações que o E1. Este evento não ocorreu no atual estudo, podendo estar relacionado a pouca distância entre o descarte e coleta, visto que a ETE estudada está localizada no próprio campus.

5.4.2. Efluente Tratado

Assim como nas amostras de esgoto bruto, em todas as amostras de efluente tratado analisadas foi possível identificar e quantificar os 4 hormônios estrogênicos estudados. As médias quantificadas em $\mu\text{g L}^{-1}$ foram: $5,0616 \pm 3,3655$ de E1; $4,1905 \pm 3,5265$ de E2; $7,7432 \pm 3,9512$ de E3, $2,5499 \pm 2,1616$ de EE2.

A terceira amostra coletada no dia 29/07/2015 não foi utilizada para esta compilação por ter apresentado resultados, cerca de, 10 vezes superiores aos obtidos nas

demais amostras, e menor correlação dos pontos das curvas de adição de padrão, entre 0,93 e 0,95.

Tal dispersão pode ser verificada na Tabela 15 que apresenta todas as concentrações obtidas por amostra de efluente tratado.

Tabela 15 - Concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios estrogênicos por amostra de efluente tratado avaliada.

Data	E1	E2	E3	EE2
26/jun	8,4102	2,6095	0,9710	3,3996
16/jul	2,7300	1,1323	7,4799	0,5396
16/jul	6,1959	4,1363	10,1826	6,0961
29/jul	0,1631	0,5642	9,9959	0,8359
29/jul	45,4050	49,8638	107,1254	38,1362
19/ago	8,7726	9,4829	10,0864	1,0183
19/ago	4,0976	7,2178	NA	3,4098

Legenda: NA - Não avaliado.

Fonte: Arquivo pessoal.

As concentrações obtidas e as frequências de detecção são bastante superiores às encontradas em outros trabalhos consultados assim como ocorreu no esgoto bruto. Nestes, as concentrações (ng L^{-1}) variaram entre: menor que 0,4 e 720 de E1; 0,2 e 190 de E2; 0,0 e 150 de E3; 1,0 e 140 de EE2. (FONSECA; CARDOSO; ESTEVES, 2013; JANEX-HABIBI et al., 2009; SERVOS et al., 2005; STANFORD; WEINBERG, 2010; TERNES; KRECKEL; MUELLER, 1999; XU et al., 2014).

Pessoa et al. (2012) também encontraram elevadas concentrações dos hormônios em efluente tratado por sequencia de lagoas no Ceará: até 2080 ng L^{-1} de E1; e até 397 ng L^{-1} de E2. Do mesmo modo que o corrente trabalho, o esgoto bruto também continha elevadas concentrações dos hormônios.

As concentrações médias e os desvios padrões para cada um dos hormônios estudados no esgoto bruto e efluente tratado são apresentados na Figura 8, em que se pode perceber pequena redução na concentração de E1(2 %), aumento na concentração de E3 (49 %) e redução nas concentrações de E2 (44 %) e EE2 (55 %) após o tratamento secundário.

No trabalho de Kvanli et al. (2008) em ETEs usadas em estações espaciais da NASA, baixas remoções e acréscimo das concentrações dos hormônios, também, foram encontradas. Estes efeitos foram atribuídos à desconjugação dos hormônios dos grupamentos sulfatos e glicuronídeos, com os quais são excretados na urina, durante o tratamento de esgoto com a produção dos hormônios nas formas livres. Assim como no corrente trabalho, os hormônios conjugados não foram pesquisados e, provavelmente,

estavam presentes no esgoto bruto, dado que este foi composto exclusivamente de urina. Os autores apontam que não houve tempo suficiente para que a desconjugação acontecesse antes da aplicação do esgoto na ETE.

Figura 8 - Resultados médios e desvio padrão dos hormônios no esgoto bruto e no efluente tratado.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tal afirmação é possível devido ao estudo de D'Ascenzo et al. (2003) que mostraram como se altera o perfil dos hormônios estrogênicos no esgoto desde a sua eliminação na urina até o lançamento do efluente tratado, passando por tanques sépticos e chegada da ETE. Os autores averiguaram como se reduz a concentração dos hormônios estrogênicos conjugados, principalmente os glucocorticóides, e aumenta a concentração dos hormônios livres desde a excreção até a chegada à ETE, após um tempo de trânsito de cerca de 2 horas.

Servos et al. (2005) estudaram a remoção de estrona e 17- β -estradiol em 18 diferentes ETEs em operação no Canadá. Em 2 e 4 das ETEs estudadas, as concentrações de 17- β -estradiol e estrona, respectivamente, aumentaram no efluente tratado. Os autores apontaram a desconjugação com produção dos hormônios nas formas livres como uma das razões para estes aumentos. Além disto, a elevação mais frequente na concentração de estrona no efluente tratado pode ser consequência da oxidação parcial de outros hormônios estrogênicos à estrona conforme relatado por Alvarino et al. (2014), D'Ascenzo et al. (2003), Kumar et al. (2012), Li et al. (2008) e Zheng et al. (2013).

Desta maneira, as elevadas concentrações deste trabalho devem ser consequência das altas concentrações dos hormônios no esgoto bruto, da ineficiência do

processo para remoção destes compostos e da ocorrência de desconjugação dos hormônios durante o tratamento, além da oxidação dos outros hormônios com produção de estrona (E1).

5.4.3. Remoção dos hormônios na ETE

O aumento na concentração dos hormônios estrogênicos no efluente do tratamento de esgoto pode ser considerado exceção, dado à grande quantidade de trabalhos que apontam a remoção satisfatória destes compostos por tratamentos biológicos (FERREIRA, 2013; FONSECA; CARDOSO; ESTEVES, 2013; JANEX-HABIBI et al., 2009; NAKADA et al., 2005; PESSOA et al., 2014; SERVOS et al., 2005; TERNES; KRECKEL; MUELLER, 1999; XU et al., 2014). No presente trabalho, também ocorreram episódios de boa remoção de, ao menos, um dos hormônios estudados conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16 - Eficiências de remoção dos hormônios calculadas a partir das concentrações determinadas.

Data	E1 %	E2 %	E3 %	EE2 %
26-jun	-41 %	48 %	83 %	72 %
16-jul	-106 %	73 %	1 %	90 %
16-jul	19 %	52 %	-3078 %	35 %
29-jul	91 %	64 %	-174 %	63 %
19-ago	-116 %	-8 %	-16 %	60 %
19-ago	46 %	52 %	NA	-2063 %

Legenda: NA - Não avaliado.

Fonte: Arquivo pessoal.

Uma boa remoção de nitrogênio, acima de 80%, elevados tempos de detenção hidráulica (TDH) e de retenção de sólidos (TRS) e uma baixa carga orgânica alimentada têm sido apontados como fatores que impactam positivamente na remoção dos hormônios estrogênicos durante a etapa biológica de estações de tratamento de esgoto por lodos ativados (JOHNSON et al., 2005; LI et al., 2008; PESSOA et al., 2014).

Destes fatores, não foi possível quantificar o tempo de retenção de sólidos. Os demais foram determinados e os resultados por coleta são apresentados na Tabela 17. O TDH foi fixo em 02h05min durante o período de amostragem. A carga orgânica alimentada variou bastante nas diferentes amostras, assim como a remoção de NTK, conforme já discutido na caracterização da ETE.

Tabela 17 - Resultados de eficiência de remoção de nitrogênio, tempo de detenção hidráulica e carga alimentada por batelada avaliada.

Data	Remoção NTK %	TDH horas	Carga Alimentada mg DQO. L ⁻¹
26-jun	3 %	02h05min	284
16-jul	-54 %	02h05min	110
16-jul	-49 %	02h05min	108
29-jul	-2 %	02h05min	105
19-ago	24 %	02h05min	146
19-ago	20 %	02h05min	181

Legenda: NTK- nitrogênio total Kjeldahl; TDH – tempo de detenção hidráulica; Carga alimentada – DQO do esgoto bruto.

Fonte: Arquivo pessoal.

No trabalho de Servos et al. (2005), já citado anteriormente, das 18 diferentes ETEs avaliadas para a remoção dos hormônios E1 e E2, 14 ETEs apresentaram remoção acima de 75 % de E2 e 11 ETEs apresentaram remoção acima de 75 % de E1. Das 3 ETEs que apresentaram remoção de E2 insatisfatória (abaixo de 75 %), apenas 1 utilizava sistema de lodos ativados. Esta ETE que removeu apenas 40 % de E2, também apresentou baixa remoção de nitrogênio, 45 %. No corrente trabalho, a remoção de nitrogênio não alcançou 45 % em nenhuma das ocasiões avaliadas, mesmo assim remoções acima de 40 % de um dos hormônios estudados ocorreram em 57 % das bateladas avaliadas.

Nakada et al. (2006) determinaram remoções acima de 80 % para os hormônios E1, E2 e E3 em 2 diferentes ETEs de Tóquio com TDH de 7 e 10 h e TRS de 4 e 7 dias, considerado insuficiente para a ocorrência de nitrificação.

Johnson et al. (2005) estudaram a remoção de estrona e outros disruptores endócrinos em 17 diferentes ETEs em operação na Europa. A remoção de E1 variou entre 59 e 99 % nas 15 ETEs com tratamento biológico por lodo ativado. A ETE de Eindhoven (Ei) apresentou o menor TDH, 01h18min, e remoção de 94 % de E1. Porém, no presente trabalho, o TDH foi de 02h05min e 91 % foi a maior remoção de E1 obtida em uma das bateladas estudadas. O melhor resultado obtido por Johnson et al. (2005) pode estar relacionado aos 25 dias de tempo de retenção de sólidos (TRS), que permite o desenvolvimento de micro-organismos nitrificantes; à existência de zona anóxica para a remoção de nitrogênio; ou à estimativa inadequada da concentração de E1 no esgoto, utilizada para o cálculo da remoção.

Janex-Habibi et al. (2009) estudaram a remoção de E1 e E2, entre outros disruptores endócrinos, em 13 diferentes ETEs da Europa e USA. Destas, 9 ETEs utilizavam sistema de lodos ativados como tratamento biológico apresentando remoção média de E1 de 85 % e remoção média de E2 de 92 %. Tal remoção pode estar associada ao tempo de detenção hidráulica entre 5 e 30 horas, ao tempo de retenção de sólidos entre 10 e 16 horas ou aos sistemas possuírem etapas para remoção biológica de nitrogênio.

A baixa carga orgânica alimentada no tratamento biológico, quando comparada a valores encontrados em outros estudos (ANDERSEN et al., 2003; CARBALLA et al., 2005; FERREIRA, 2013), pode ser o fator que permitiu alguma remoção dos hormônios na ETE estudada, mesmo que em condições adversas de remoção de nitrogênio e curto tempo de detenção hidráulica do corrente estudo.

Li et al. (2008) estudaram a remoção de E1 e E2 em diferentes concentrações de glicose a fim de simular diferentes cargas orgânicas de alimentação. Ficou evidente neste trabalho que os tempos de biodegradação, até o desaparecimento destes 2 compostos, aumentaram com o aumento da concentração de glicose.

6 CONCLUSÕES

A ETE da Escola de Engenharia de Lorena/USP apresenta desempenho similar a outros sistemas de lodos ativados convencionais, com boa remoção de matéria orgânica carbonácea e baixa remoção dos nutrientes fósforo e nitrogênio.

Comparando com as referências levantadas, as concentrações dos hormônios estrogênicos determinadas no esgoto bruto são bastante elevadas, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, assim como, a frequência de detecção destes neste tipo de matriz. Tais particularidades podem estar relacionadas ao perfil do empreendimento com baixa geração de esgoto per capita e, aparente, maior predominância da urina na composição do esgoto gerado.

Assim como no esgoto bruto, as concentrações dos hormônios no efluente tratado também foram bastante elevadas e com maior frequência de detecção, consequência da alta carga de hormônios na entrada da ETE. Além disso, pode ter ocorrido desconjugação dos hormônios as formas livres durante o tratamento, visto que o tempo decorrido entre a geração e o tratamento é reduzido em relação ao que ocorre em ETES municipais.

A remoção parcial dos hormônios pode, também, estar relacionada ao menor tempo de detenção hidráulica deste sistema frente a outros citados na literatura consultada e a não existência de dispositivos e condições para a remoção de nitrogênio.

O método cromatográfico desenvolvido apresentou resultados admissíveis de exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação, entretanto, para a aplicação em matrizes complexas como o esgoto e o efluente, a quantificação deve ser feita pela abordagem de adição de padrão ao eluato, devido à baixa seletividade.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, recomenda-se a continuidade dos estudos nos seguintes aspectos:

- Realização de estudos ecotoxicológicos com o efluente da ETE para avaliar o impacto das altas concentrações de hormônios encontrados em organismos aquáticos;
- Determinar as concentrações dos hormônios conjugados no esgoto e no efluente;
- Aprimorar a remoção de nitrogênio na ETE com a implantação de controles e novos procedimentos, como: o descarte diário de líquido para atingir idade de lodo recomendável a nitrificação; controle da aeração por oxímetro ou controlador de potencial de oxi-redução (ORP).
- Utilizar a metodologia desenvolvida para a determinação de hormônios em ETE municipal a fim de validar a aplicação do método desenvolvido em concentrações menores dos hormônios.

REFERÊNCIAS⁵

ALVARINO, T. et al. Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 506-513, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389414004889>>. Acesso em: set. 2014.

AMSTISLAVSKY, S. et al. Preimplantation exposures of murine embryos to estradiol or methoxychlor change postnatal development. **Reproductive Toxicology**, v. 18, i. 1, p. 103-108, jan/fev, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623803001540>>. Acesso em: fev. 2015.

ANDERSEN, H. et al. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. **Chemosphere**, v. 61, p. 139–146, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157176>>. Acesso em: dez. 2015.

APHA (1998). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: American Public Health Association, 1998.

BRASIL, **Diagnóstico dos serviços de água e esgotos – 2013**, Brasília, DF, 2014. Disponível em <<http://www.snis.gov.br/PaginaCarrega.php?EWRErterterTERTer=105>>. Acesso em: jan. 2015.

BRITO, N. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/pesticidas/article/view/3173/2546>>.

CANAVER, E. **Otimização e validação de método cromatográfico para determinação de 17- β - estradiol, estrona e estriol em solo com esterco animal e lodo de ETE**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

CARBALLA, M. et al. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, p. 2918–2926, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135404001642>>. Acesso em: dez. 2015.

⁵ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

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

CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas**. São Paulo: CETESB, 2011, 326 p. Disponível em: <<<http://www2.ana.gov.br/Paginas/catalogopublicacoes.aspx>>>. Acesso em: ago. 2014.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 86, p. 1671–1692, 2010. Disponível em:<< <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-010-2547-x>>>. Acesso em: maio. 2014.

COLMENAREJO , M. et al. Evaluation of municipal wastewater treatment plants with different technologies at Las Rozas, Madrid (Spain). **Journal of Environmental Management**, v. 81, p. 399–404, 2006. Disponível em: << <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479705003580>>>. Acesso em: nov. 2015.

D’ASCENZO, G. et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**. v. 302, p.199–209, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896970200342X>>. Acesso em: maio 2015.

DIAS, D. et al. Desempenho de sistema de tratamento de esgoto para pequenas comunidades composto por reator UASB, lagoas de polimento em série (lagoa sem chicana e lagoa com chicana) e filtro grosseiro de pedra. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 28º, 2015, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Disponível em: <<<http://www.researchgate.net/publication/283684230>>>. Acesso em: nov. 2015.

DUPONT, A.; LOBO, E. Evaluation of the efficiency of the sewage treatment plant from the University of Santa Cruz do Sul (UNISC), RS, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, n. 2, p. 119-126, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S2179-975X2012005000031>>>. Acesso em: nov. 2015.

EKAMA, G. The role and control of sludge age in biological nutrient removal activated sludge systems. **Water Science & Technology**,v. 61, n.7, p. 1645-1652, 2010. Disponível em: << <http://wst.iwaponline.com/content/61/7/1645>>>. Acesso em: jun. 2015.

EUSEBI, A. et al. Switching small WWTPs from extended to intermittent aeration: Process behaviour and performances. **Water Science and Technology**, v. 58, n.4, p. 865–

872. 2008. Disponível em: <<<http://doi.org/10.2166/wst.2008.333>>>. Acesso em: jun. 2015.

FERREIRA, A. Endocrine disruptors in sludge wastewater treatment plants: environmental complications. **Acta Scientiarum – Technology**, v. 35, n. 2, p. 307-316, 2013. Disponível em: <<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/10619>>>. Acesso em: nov. 2014.

FONSECA A; CARDOSO M; ESTEVES V. Determination of Estrogens in Raw and Treated Wastewater by High-Performance Liquid Chromatography- Ultraviolet Detection. **Journal of Environmental e Analytical Toxicology**. v.4, i:1; p. 1-5; 2013. Disponível em: <<<http://www.omicsonline.org/determination-of-estrogens-in-raw-and-treated-wastewater-by-highperformance-liquid-chromatographyultraviolet-detection-2161-0525.1000203.php?aid=21744> 10.4172/2161- 0525.1000203. Acesso em: nov. 2015.

GHISELLI,G; JARDIM, W. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v.30, n. 3, maio/jun. 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/31.pdf>>. Acesso em: fev. 2014.

HAANDEL, A.; EKAMA, G.; MARAIS, G. The activated sludge process-3 single sludge denitrification. **Water Research**. v. 15, p. 1135-1152, 1981. Disponível em: <<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043135481900890>>>. Acesso em: jun. 2015.

HAANDEL, A.; LUBBE; J. **Handbook of Biological Wastewater Treatment**: Design and Optimization of Activated Sludge Systems. IWA Publishing, 2012. 770p. ISBN 97817804000808.

HACKNEY, Z. Inverse Effects On Growth And Development Rates By Means Of Endocrine Disruptors In African Clawed Frog Tadpoles (*Xenopus laevis*). **The NCSSSMST Journal**. v. 12, i. 2; p. 810, 2007; Disponível em <<http://courses.ncssm.edu/biology/faculty/sheck/Journal%20S07.pdf>>. Acesso em: jan. 2015.

HALL, J. Introdução à Endocrinologia. In:_____. (Org). **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 927-939.

HALL, J. Fisiologia Feminina antes da gravidez e hormônios Femininos. In:_____. (Org). **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 1041-1057.

HORAN, N. Suspended growth processes. In: MARA, D; HORAN, N. (Org) **The handbook of water and wastewater microbiology**. Ed. Academic Press, 2003, p. 351-360. ISBN 0-12-470100-0;

INSEL, G. et al. Optimization of Nitrogen Removal for Alternating Intermittent Aeration-Type Activated Sludge System: A New Process Modification, *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, v. 41, n. 9, p. 1819-1829, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10934520600778994>>>. Acesso em: ago. 2015.

IPCS (International Programme on Chemical Safety) **Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors**. 2002. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/>. Acesso em: nov. 2015.

JAFARI, J.; ABASAD, P.; SALEHZADEH, A. Endocrine disrupting contaminants in water resources and sewage in Hamadan city of Iran. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 6, n. 2, p. 89-96, 2009. Disponível em: <<https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/62217/1/se09015.pdf>>>. Acesso em: dez. 2015.

JANEX-HABIBI, M.L. et al. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment. **Water Research**, v.43, p. 1565–1576, 2009. Disponível em: <<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135409000049>>>. Acesso em: mar. 2015.

JARDIM, I. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010. Disponível em:<< <http://www.scientiachromatographica.com/files/v2n1/v2n1a2.pdf> >>. Acesso em: mar. 2015.

JENKINS, D; RICHARD, M; DAIGGER, G. **Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming**, 2nd. Chelsea: Lewis Publishers, 1993. 193 p.

JOHNSON, A. et al. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. **Water Research**. v.39, p.47–58, 2005. Disponível em: << <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607163> >>. Acesso em: abr. 2014.

JOHNSON, A.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, n. 2-3, p. 163-173, jul 2000. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10902843>>. Acesso em: mar. 2014.

JOHNSON, A. C.; SUMPTER, J. P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 24, p. 4697-4703, dez 2001. Disponível em: <<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es010171j>>>. Acesso em: abr. 2014.

KANG, J.; HICK, A.; PRICE, W. Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 4065-4072, 2007. Disponível em: <<<http://ro.uow.edu.au/scipapers/1105>>>. Acesso em: jan. 2016.

KOH, Y.K.K. et al. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 81–87, 2007. Disponível em: <<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307017049>>>. Acesso em: abr. 2014.

KUMAR, V. et al. How seasonality affects the flow of estrogens and their conjugates in one of Japan's most populous catchments. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2906-2912, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600683>>>. Acesso em: maio 2015.

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, maio 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389412004839#>>>. Acesso em: maio 2015.

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35 p. 997–1003, 2009. Disponível em: <<<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.04.006>>>. Acesso em: nov. 2015.

KVANLI, D. et al. Monitoring Estrogen Compounds in Wastewater Recycling Systems. **Water Air Soil Pollution**, v. 188, p. 31–40, 2008. Disponível em: <<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11270-007-9498-6>>>. Acesso em: nov. 2015.

LAPA, K. **Avaliação de desempenho do reator anaeróbio em batelada seqüencial (asbr), contendo biomassa imobilizada em pedra pome, para tratamento de esgoto sanitário**. 2003. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

LÄNGE, R. et al. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.20, n.6, p. 1216–1227, jun 2001. ISSN 0730-7268. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11392131>>. Acesso em: abr. 2014.

LARSSON, D. G. J. et al. Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? **Aquatic Toxicology**, v. 45, n. 2-3, p. 91-97, abr 1999. ISSN 0166-445X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X9800112X>>. Acesso em: mar. 2014.

LENARDÃO, E. “Green Chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003. Disponível em: << http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol26No1_123_19.pdf>. Acesso em: maio 2015.

LI, F. et al. Behavior of natural estrogens in semicontinuous activated sludge biodegradation reactors. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2964–2971, 2008. Disponível em: << <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714942>>>. Acesso em: jul. 2015.

LIAO, B. et al. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. **Water Research**. v. 35, n.2, p. 339-350, 2001. Disponível em: << <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135400002773> >>. Acesso em: maio 2015.

LIMA, D. et al. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. **Talanta**, n.115, p. 980–985, 2013. Disponível em: << <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054691>>>. Acesso em: jan. 2015.

LIZ, M.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Considerações sobre o preparo de amostras contendo micropoluentes estrogênicos. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1213-1215, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000600027>>>. Acesso em: jun. 2014.

MADONI, P. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. **Water Research**. v. 28, p. 67-65, 1994. Disponível em: <<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043135494901201#>>>. Acesso em: mar. 2014.

_____. Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency. In: MARA, D; HORAN, N. (org) **The handbook of water and wastewater microbiology**. Ed. Academic Press, 2003. p. 361-372. ISBN 0-12-470100-0

METCALF; EDDY. **Wastewater engineering**: Treatment and reuse. 4th ed. Boston: McGraw Hill Professional; 2003. 1820 p. ISBN 0-07-041878-0.

MUZ, M. et al. Removal of endocrine disrupting compounds in a lab-scale anaerobic/aerobic sequencing batch reactor unit. **Environmental Technology**, v. 35, n. 9, p. 1055-1063, maio 2014. ISSN 0959-3330. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24701901>>>. Acesso em: out. 2014.

MUZ, M. et al. Determination of selected natural hormones and endocrine disrupting compounds in domestic wastewater treatment plants by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry after solid phase extraction. **Analyst**, v. 137, p. 884-889, dez 2011. Disponível em: <<<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2012/an/c2an15644j>>>. Acesso em: out. 2014.

NAKADA, N. et al. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 12, p. 2807–2815, 2004. Disponível em: <<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/03-699.1/abstract>>>. Acesso em: mar. 2015.

NAKADA, N. et al. Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water Research**, v. 40, p. 3297–3303, 2006. Disponível em: <<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135406003952>>>. Acesso em: jun. 2015.

OLIVEIRA, S.; SPERLING, M. Performance evaluation of different wastewater treatment technologies operating in a developing country. **Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development**, v. 01, n. 01, p. 37-56, 2011. Disponível em: <<<http://washdev.iwaponline.com/content/1/1/37>>>. Acesso em: jan. 2016.

PARDINI, D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v.58, n.2, p. 172-181, 2014. Disponível em: <<<http://dx.doi.org/10.1590/0004-2730000003044>>>. Acesso em: maio 2015.

PESSOA, G. et al. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **The Science of the total environment**, v. 490, p. 288-295, 2014. Disponível em: <<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714006664>>>. Acesso em: nov. 2015.

PESSOA, G. et al. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000500019>>. Acesso em: ago. 2015.

RAYNIE, D.; WATSON, D. Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. **LCGC North America**. v. 32, n. 12, dez 2014. Disponível em: <<<http://www.chromatographyonline.com/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-1?pageID=2>>>. Acesso em: mar. 2015.

REN, Y. et al. Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. **Water research**, v. 41, p. 3089-3096, 2007, Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17544475>>>. Acesso em: maio 2015.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUCHIRASET, A.; CHINWETKITVANICH, S. Occurrence of estrogens in wastewater treatment plants and surface water in Bangkok area, Thailand. **Advanced Materials Research**, v.931-932, p. 721-726, 2014. Disponível em: <<<http://www.scientific.net/AMR.931-932.721>>>. Acesso em: dez. 2015.

RUSSO, L.A. Osteoporose Pós-Menopausa: Opções Terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v.45, n.4, p. 401-406, ago 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302001000400013>>. Acesso em: maio 2015.

SANTOS, E. et al. Avaliação da sustentabilidade ambiental do uso de esgoto doméstico tratado na piscicultura. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.16, n. 1, p. 45-54, jan/mar. 2011. Disponível em: <<<http://www.scielo.br/pdf/esa/v16n1/a08v16n1.pdf>>>. Acesso em: nov. 2015.

SCHMIDT, P. The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 19, n. 3, p. 257-271, 2012. Disponível em: <<<http://www.menopause.org/docs/default-document-library/psht12.pdf>>>. Acesso em: maio 2015.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. São Paulo: Santos, 2011. 611p. ISBN 978-85-7288-042-8.

SERVOS, R. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**. v.336, p. 155–170, 2005.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969704004565>. Acesso em: set. 2015.

SILVA, C.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 38-58, 2012. Disponível em: <<[<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749112000668#>>](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749112000668#)>. Acesso em: abr. 2014.

SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J. **Introduction to modern liquid chromatography**, 3rd. Hoboken: John Wiley and Sons; 2009. 912 p. ISBN 978-0-470-16754-0.

SODRÉ, F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 92–98, 2010. Disponível em: <<[<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749112000668#>>](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749112000668#)>. Acesso em: nov. 2015.

SPERLING, M. **Lodos Ativados**, 2^o ed. Belo Horizonte: UFMG; 1997. 415p. ISBN: 8570411295.

STANFORD, B.; WEINBERG, H. Evaluation of OnSite Wastewater Treatment Technology to Remove Estrogens, Nonylphenols, and Estrogenic Activity from Wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 8, p. 2994-3001, abr 15, 2010. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276556000040>>. Acesso em: mar. 2015.

TANNA, R. et al. Occurrence and degree of intersex (testis–ova) in darters (*Etheostoma* spp.) across an urban gradient in the Grand River, Ontario, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 1981–1991, 2013. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000322253800008 >>. Acesso em: out. 2014.

TERNES, T.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 91–90, jan/1999. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028705>>>. Acesso em: abr. 2014.

TORRES, N. **Determinação de hormônios e antimicrobianos no Rio Piracicaba e testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna***. 2014. 102 f. Tese (Doutor em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

XIAO, X. et al. Co-precipitation assisted cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of estrogens in water and

cosmetic samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 6376-6381, 2013. Disponível em: <<<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2013/ay/c3ay41372a>>>. Acesso em jan. 2015.

XU, Y. et al. Occurrence and removal of free and conjugated estrogens in wastewater and sludge in five sewage treatment plants. **Environmental Sciences: Processes And Impacts**, v. 16, p. 262-270, 2014. Disponível em: <<http://www.researchgate.net/publication/259253914>>. Acesso em: nov. 2015.

XUE, W. et al. Elimination and fate of selected micro-organic pollutants in a full-scale anaerobic/anoxic/aerobic process combined with membrane bioreactor for municipal wastewater reclamation. **Water Research**, v. 44, p. 5999-6010, 2010. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723962>>>. Acesso em: abr. 2014.

YU, Y.; WU, L., CHANG, A. 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. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178835>>>. Acesso em: abr. 2015.

ZHAO, H.; MAVINIC, D.; OLDHAM, W.; KOCH, F. Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification in a two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. **Water Research**, v. 33, n. 4, p. 961-970, 1999. Disponível em: <<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135498002929>>>. Acesso em: ago. 2015.

ZHENG, W. et al. Fate of estrogen conjugate 17- α -estradiol-3-sulfate in dairy wastewater: Comparison of aerobic and anaerobic degradation and metabolite formation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 259, p. 109-115, 2013. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23708453>>>. Acesso em: abr. 2014.

ZHOU, Y. et al. An alternative method for the determination of estrogens in surface water and wastewater treatment plant effluent using pre-column trimethylsilyl derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. **Environmental monitoring and assessment**, v. 158, p. 35–49, 2009. Disponível em: <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937040>>. Acesso em: dez 2015.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993699001508>>>. Acesso em: dez. 2015.