

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM SANEAMENTO E MEIO AMBIENTE

MONOGRAFIA DE FINAL DE CURSO

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE REMOÇÃO
DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS DE ÁGUA
PARA ABASTECIMENTO DOMÉSTICO**

Cláudio Júnior Andrade Ribeiro

Belo Horizonte

2012

CLÁUDIO JÚNIOR ANDRADE RIBEIRO

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE REMOÇÃO DE
DISRUPTORES ENDÓCRINOS DE ÁGUA PARA
ABASTECIMENTO DOMÉSTICO**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Saneamento e Meio Ambiente da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Saneamento e Meio Ambiente.

Área de concentração: Tratamento de Águas de Abastecimento e Residuárias.

Orientador: Marcelo Libânio

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter permitido vivenciar e superar várias situações adversas contribuindo de forma impar para meu desenvolvimento tanto como pessoa quanto profissional.

Ao professor Valter, pela instrução e por ter mostrado outros caminhos quando tudo parecia sem saída.

Ao professor Marcelo, por ter prontamente aceitado orientar este trabalho.

A Terezinha, minha mãe, que muito se empenhou para que eu matriculasse neste curso.

Á FUMP pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que de certa forma contribuíram para a conclusão desta longa caminhada.

RESUMO

Diversas classes de substâncias de elevado potencial estrogênico estão presentes nas águas que consumimos para os diversos fins no dia a dia. Compreendem substâncias, naturais ou sintéticas, usadas para as mais variadas finalidades: matéria-prima e, principalmente nas indústrias de medicamentos, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas, alimentos, produtos de limpeza, dentre outras indústrias químicas. Tais substâncias são chamadas de desreguladores endócrinos. Elas são capazes de mimetizar as funções hormonais do organismo podendo provocar sérias alterações e até mesmo desencadear processos carcinogênicos.

Este trabalho aborda, em especial, algumas tecnologias empregadas na remoção de substâncias com função desreguladora do sistema endócrino, mais precisamente, substâncias estrogênicas como 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol.

Assim, estudos recentes têm revelado a dificuldade enfrentada por Estações de Tratamento de Água convencionais na remoção de microcontaminantes presentes em água em concentrações ng.L^{-1} . O uso da ozonização mostrou-se eficiente como tecnologia empregada na remoção de desreguladores endócrinos, demonstrando remoção superior a 99%, no entanto, essa pequena quantidade que não foi inativada pelo ozônio ainda representa grande risco para a saúde. Risco que pode ser potencializado pela presença de subprodutos da ozonização. Pesquisas demonstraram que enquanto a remoção de estrogênios foi muito eficiente a atividade estrogênica aumentou vertiginosamente.

As técnicas empregadas nas pesquisas não são totalmente aplicáveis em escala real, uma vez que, compostos orgânicos presentes na água podem consumir grande parte de ozônio empregado além de criar diversos subprodutos que podem apresentar atividade estrogênica muito maior que o próprio estrogênio inicial.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-NP	Nonilfenol
C18	Grupo Octadecilsilano
CAS	Compêndio de Substâncias Químicas
CG/MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDE	2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno
DDT	2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1 tricloroetano
DDT	2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano
DE	Desreguladores Endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
EE2	17 α -etinilestradiol
ENV	Resina de Copolímero Poliestireno
ETA	Estação de Tratamento de Água

ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FSH	Hormônios Folículo-Estimulante
GC	Cromatografia Gasosa
GnRH	Secreção Hormonal Gonadotrófica
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HO [•]	Radical Hidroxila
HRMS	Espectrometria de Massas De Alta Resolução
IPCS	Interntional Programe on Chemical Saflety
K _{oc}	Coeficiente de Partição
K _{ow}	Coeficiente de Partição Octanol/Água
LC	Cromatografia Líquida
LH	Hormônio Luteinizante
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria De Massas/ Espectrometria De Massas
O ₃	Ozônio
OEDC	Organization for Enconomic Co-operation and Development
OH	Hidroxila

OMS	Organização Mundial de Saúde
PAC	Policloreto Alumínio
PCB	Bifenilas PoliCloradas
PFHP	Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal
PNRH	Plano Nacional de Recursos Hídricos
POA	Processos Oxidativos Avançados
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
ppb	Partes por Bilhão
ppt	Parte por Trilhão
PROSAB	Programa de Pesquisas em Saneamento Básico
RMBH	Região Metropolitana de Belo Horizonte
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
SANASA	Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento
SPE	Extração em Fase Sólida
STP	Substâncias Tóxicas Persistentes
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
THM	Trihalometanos

USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Radiação Ultravioleta
VTG	Vitelogenina
YES	Yeast Estrogen-Inducible Expression System Ou Recobinant Yeast Estrogenic System

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Principais aplicações dos produtos farmacêuticos e de higiene pessoal.....	22
Tabela 3.2 - Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.....	31
Tabela 3.3 - Estruturas químicas dos estrogênios 17 β -estradiol, estrona, estriol e 17 α -estradiol e do colesterol.	36
Tabela 3.4 - Excreção diária (μ g) per capita de estrogênios por humanos	37
Tabela 3.5 - Propriedades físico-químicas dos estrogênios.....	38
Tabela 3.6 - Algumas fontes de hormônios.....	41
Tabela 3.7 - Concentrações de substâncias estrogênicas identificadas em afluentes e efluentes de ETEs, rios e águas de abastecimento, em diversos países segundo vários autores.....	42
Tabela 3.8 - Variações da concentração de estriol nos dois mananciais da RMSP..	46
Tabela 3.9 - Constante da taxa de reação de compostos orgânicos com ozônio	52
Tabela 3.10 - Condições de operação das ETA Campinas e Sumaré estudadas no período das coletas.....	58
Tabela 3.11 - Parâmetros das águas analisadas	60
Tabela 3.12 - Parâmetros das águas analisadas	61
Tabela 3.13 - Concentrações remanescentes de etinilestradiol (μ g.L ⁻¹) após experimento-teste de pré-oxidação com hipoclorito de sódio – Água Tipo II	61
Tabela 3.14 - Eficiência média de remoção de etinilestradiol, em função do tempo de contato-experimento teste.....	62

Tabela 3.15 - Concentração de etinilestradiol quantificadas nas amostras coletadas da realização dos ensaios de pré-oxidação – Água tipo I e II..62

Tabela 3.16 - Eficiência média de remoção de 17 α -Etinilestradiol por pré-oxidação, em função do tempo de contato – Águas do Tipo I e II63

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 3.1 – Rota de transportes de contaminantes.....	20
Figura 3.2 - Fórmulas estruturais de alguns PFHP.....	23
Figura 3.3 - Principais glândulas endócrinas.....	26
Figura 3.4 - Fluxograma do sistema reprodutor endócrino.....	29
Figura 3.5 - Mecanismo de atuação do desreguladores endócrinos.....	29
Figura 3.6 - Ação dos hormônios no sistema endócrino.....	30
Figura 3.7 - Estrutura química do 17 β -estradiol.....	39
Figura 3.8 - Estrutura química do 17 α – etinilestradiol.....	40
Figura 3.9 - Variações da concentração de estriol nos três mananciais da RMBH	44
Figura:3.10 - Variações da concentração de estriol nos três mananciais da RMSP.....	45
Figura 3.11 - Etapas do procedimento de extração em fase sólida.....	48
Figura 3.12 - Diagrama do principio de operação de um espectrômetro de massa.....	50
Figura 3.13 – Reatividade do ozônio com grupo fenólico estrogênio.....	52
Figura 3.14 – Concentração inicial da solução de 17 β -Estradiol 10 e 50 μ g/L.....	53
Figura 3.15 - Remoção de 17 β -Estradiol e17 α -Etinilestradiol pelo processo de ozonização em pH 3, 7, 11.....	54
Figura 3.16 - Remoção da mistura 17 β -Estradiol/17 α -Etinilestradiol pelo processo de ozonização em pH 3 e pH 7.....	55

Figura 3.17 - Remoção da mistura 17 β -Estradiol/17 α -Ethinilestradiol pelo processo de ozonização em pH 7 e pH 11.....	55
Figura 3.18 - Consumo de O ₃ durante a ozonização dos estrogênios nos três valores de pH.....	56
Figura 3.19 – Comparação do consumo de ozônio durante a ozonização dos estrogênios em mistura e separados, nos valores de (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	57
Figura 3.20 - Características das águas analisadas.....	60
Figura 3.21 – Concentração remanescente de EE2 ao longo do ensaio de pré-oxidação com hipoclorito de sódio – Água Tipo I e II.....	63
Figura 3.22 - Diagrama uniaxial de pontos para comparação das eficiências de remoção entre as amostras do experimento de sedimentação e os brancos dos ensaios de pré-oxidação – Águas Tipo I e II.....	64
Figura 3.23 - Remoção do EQ-E2 dos extratos das amostras ozonizadas.....	66
Figura 3.24 – EQ-E2 dos extratos das amostras ozonizadas de 17 β - estradiol/17 α – etinilestradiol nos três valores de pH avaliados.....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	17
	2.1 Objetivo geral.....	17
	2.2 Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
	3.1 Definição de disruptores endócrinos.....	17
	3.2 Categorias de contaminantes orgânicas presentes em mananciais de água para abastecimento.	18
	3.3 Disruptores endócrinos	21
	3.4 Ocorrências de fármacos, metabólicos e disruptores endócrinos no meio ambiente.....	21
	3.5 Os disruptores endócrinos e a Legislação Brasileira	24
	3.6 Mecanismos de ação dos disruptores endócrinos	24
	3.6.1 Sistema endócrino.....	24
	3.6.2 Mecanismos de ação dos disruptores endócrinos	28
	3.7 Efeitos provocados por disruptores endócrinos na saúde humana	32
	3.8 Efeitos provocados por disruptores endócrinos na saúde animal.....	32
	3.9 Substâncias classificadas como disruptores endócrinos que têm recebido maior enfoque pelos pesquisadores no momento.....	33
	3.10 Classificação dos disruptores endócrinos.....	33

3.10.1 Disruptores naturais.....	33
3.10.2 Sintéticos ou de origem antrópica	34
3.11 Propriedades físico-químicas dos estrogênios	37
3.12 Rota dos esteróides no organismo	38
3.12.1 17 β -estradiol	39
3.12.2 17 α – etinilestradiol	40
3.12.3 Contaminação de mananciais por estrogênios.....	41
3.13 Áreas potencialmente críticas no Brasil.....	42
4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA ANÁLISE DE ESTROGÊNIOS EM MATRIZES AMBIENTAIS	46
4.1 Extração em Fase Sólida – EFS.....	47
4.2 Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa de Alta Eficiência CLAE	49
4.3 Espectrometria de Massas	49
4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada Espectrômetro de Massas (EM).....	50
5 COMPARAÇÃO ENTRE ALGUNS MÉTODOS EMPREGADOS NA REMOÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO DE DISRUPÇÃO ENDÓCRINA	51
5.1 Ozonização.....	51
5.2 Ozonização Na Presença De Peróxido De Hidrogênio.....	57
5.3 Pré – oxidação com hipoclorito de cloro	57
5.3.1 Pré- oxidação com hipoclorito de sódio simulando uma ETA convencional	59

5.4	Remoção de estrogênios e estrogenicidade.....	64
6	Considerações Finais	67
7	REFERÊNCIAS E BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	68
7.1	Bibliografia citada em <i>apud</i>	73

1 INTRODUÇÃO

A discussão acerca da importância de se preservar e cuidar da qualidade da água, em especial daquela destinada ao consumo humano, tem se tornado cada vez mais recorrente, no entanto, ainda são poucas as ações visando combater ou pelo menos minimizar a contaminação, por poluentes químicos, dos mananciais e cursos d'água, menos ainda se observarmos um grupo determinado: os desreguladores endócrinos. É indiscutível o fato de que o consumo de água com qualidade é essencial para a saúde e fundamental para prevenção de doenças, sobretudo aquelas decorrentes de contaminação dos sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por dejetos químicos lançados sem o tratamento adequado nos sistemas aquáticos.

No meio científico, é grande a discussão e preocupação em relação à contaminação, por poluentes orgânicos, dos cursos d'água. Alguns pesquisadores têm voltado à atenção para a necessidade de desenvolver metodologias capazes de identificar e remover substâncias denominadas disruptoras endócrinas das águas destinadas ao abastecimento doméstico, levando em conta o elevado impacto maléfico que estas substâncias provocam no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos.

Estudos revelam que, as substâncias conhecidas como disruptoras endócrinas são capazes de provocar grande perturbação e impactos prejudiciais em espécies animais, desde peixes até o homem. Esse grupo específico de contaminantes perturba e desregula, sobretudo, o sistema hormonal. Esse fator representa um potencial de risco muito elevado para a população, uma vez que os hormônios influenciam praticamente todas as demais funções dos outros sistemas. Não se pode ignorar também a possibilidade de muitas dessas substâncias estarem ligadas a diversos tipos de câncer e redução da fertilidade masculina, como acreditam alguns estudiosos.

Os disruptores endócrinos podem ser naturais ou sintéticos e são largamente empregados nas indústrias de forma geral - medicamentos, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas, alimentos, produtos de limpeza, dentre outros. Ou seja, estão presentes na rotina diária, o que torna impossível não ter contato com eles. Diante disso, fica evidente que a exposição a essas substâncias é intensa e dá-se pelas mais variadas vias: alimentação e consumo de água potável contaminada, contato com ar e solos contaminados, bem como por consumo ou manuseio de produtos industrializados de uma maneira geral.

Procurou-se, a partir de revisão bibliográfica sobre o tema, analisar as metodologias empregadas na remoção de substâncias estrogênicas, mais precisamente o Estrona, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinilestradiol, presentes em águas destinadas ao abastecimento doméstico. Estudos demonstraram que a ozonização constitui um processo eficiente na remoção destes compostos. No entanto, essa constatação não significa que os resultados são animadores, também não significa, necessariamente, que os processos atualmente empregados na identificação e remoção dos disruptores endócrinos sejam eficientes. Determinados processos dão origem a uma quantidade muito elevada de subprodutos que podem causar muitos malefícios à saúde. Malefícios estes que podem ser, muitas vezes, até mais danosos do que àqueles eventualmente causados pelos próprios desreguladores endócrinos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar, a partir de revisão bibliográfica, sobre as metodologias mais empregadas na identificação e remoção de substâncias denominadas desreguladores endócrinos nas águas destinadas ao abastecimento doméstico.

2.2 Objetivos específicos

Comparar a eficiência dos métodos de remoção de desreguladores endócrinos de água destinada ao abastecimento e consumo doméstico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Definições de disruptores endócrinos

Têm sido propostas inúmeras definições para disruptores endócrinos. Tais definições têm levado em conta o efeito maléfico que estas substâncias provocam no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos (Ghiselli, 2006).

São classificados em quatro tipos: os que ocorrem naturalmente no organismo (por exemplo: estriol, estrona, estradiol); os que são sintetizados para serem ingeridos como medicamento (por exemplo: 17 α -etinilestradiol, diazepam, etc); os “xenoestrogênios” ou externos, gerados pelas modernas indústrias químicas e presentes em produtos de uso doméstico (por ex.: nonilfenol, tributilestanho, atrazina, endrin, ...) e os fitoestrogênios

(genesteína, daidzeína, dentre outros) presentes em plantas alimentícias, muitos dos quais provocam importantes benefícios à saúde

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA), disruptor endócrino é definido como “*um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento*”. Enquanto que o Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety*, IPCS), juntamente com o Canadá, o Japão, os Estados Unidos, a OEDC (*Organization for Economic Co-operation and Development*) e a União Européia, utiliza uma definição mais abrangente, e define um disruptor endócrino como “*uma substância ou uma mistura de substâncias exógenas que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causam efeitos adversos sobre a saúde de um organismo intacto, sua descendência, e/ou (sub) populações*” (USEPA, 1998; CEC, 1999).

A tradução do termo disruptor endócrino para a língua portuguesa tem gerado algumas denominações diferentes, uma vez que é um tema recente e há poucos grupos de pesquisadores brasileiros trabalhando com esta temática. Podem ser encontradas as seguintes denominações: perturbadores endócrinos, disruptivos ou disruptores endócrinos, desreguladores endócrinos, interferentes endócrinos, estrogênios ambientais, dentre outras. A tradução exata para a palavra *disrupt* é desfazer, perturbar, interromper, por isso decidiu-se adotar o termo disruptores endócrinos para referir-se a estas substâncias, já que as mesmas interferem ou alteram, de alguma forma, o funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais (Ghiselli, 2006).

Uma das características dos disruptores endócrinos reside no seu potencial de alterar o sistema reprodutor de organismos aquáticos. Alguns pesquisadores acreditam, ainda, na possibilidade dessas substâncias estarem relacionadas com doenças tais como cânceres de mama, testicular, de próstata, e redução da fertilidade masculina (Bianchetti, 2008).

3.2 Categorias de contaminantes orgânicas presentes em mananciais de água para abastecimento.

O avanço tecnológico ocorrido a partir da 2ª Grande Guerra Mundial colocou no mercado uma variedade de substâncias ou compostos químicos utilizados para finalidades diversas,

na formulação ou como intermediários, de muitos produtos utilizados no dia-a-dia, contribuindo de forma significativa para a melhoria da qualidade de vida.

Fármacos, disruptores endócrinos e poluentes orgânicos persistentes (POP) são classes de substâncias muito investigadas devido a seus efeitos perniciosos no meio ambiente. Discutem em relação aos fármacos a possibilidade destes serem responsáveis pelo desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos. Os POP são substâncias químicas tóxicas, de baixa biodegradabilidade, o que favorece sua permanência por longos períodos de tempo no meio ambiente, sendo assim, responsáveis por fenômenos como a biomagnificação na cadeia alimentar (Bila, 2005).

Muitos dos produtos e substâncias químicas utilizados no cotidiano, quando presentes no meio ambiente, são prejudiciais à fauna, à flora e ao próprio homem, o que constitui um grande fator de risco. Devido à sua estabilidade química e baixa solubilidade em água, tais compostos se acumulam em tecido adiposo levando à sua bioacumulação ao longo da cadeia trófica, acarretando inúmeros problemas para os animais superiores (Baird, 2002).

Os seres vivos podem ser expostos aos desreguladores endócrinos pela alimentação, consumo de água potável, pelo contato com ar e solos contaminados, bem como por consumo ou manuseio de produtos industrializados (Bianchetti, 2008).

A exposição aos disruptores endócrinos tem se tornado muito intensa devido à variedade e quantidade de produtos químicos utilizados diariamente, tendo como destino final os cursos d'água, seja através dos esgotos tratados nas estações ou pelo lançamento direto. Por esta razão, é necessário avaliar as implicações da presença de certas substâncias químicas no meio ambiente, principalmente nos mananciais de água que recebem esgotos tratados ou in natura, drenagem de águas pluviais e efluentes industriais e que ainda são utilizados para o abastecimento público.

De acordo com o órgão que faz registro de todas as substâncias químicas, Serviço de Compêndio de Substâncias Químicas (CAS), em janeiro de 2009 existiam mais de 41 milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas registradas e, destas, cerca de milhares estavam disponíveis comercialmente (CAS, 2010).

As substâncias químicas, naturais ou sintéticas, são usadas para as mais variadas finalidades: matéria – prima e, principalmente, nas indústrias de medicamentos, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas, alimentos, produtos de limpeza, dentre outras

indústrias químicas. Todas apresentam potencial de desreguladores endócrinos podendo ser agrupadas da seguinte forma (BILA, 2005):

- ✚ Substâncias sintéticas: utilizadas na agricultura e seus subprodutos como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas;
- ✚ Substâncias sintéticas: utilizadas nas indústrias. Dão origem aos subprodutos: dioxinas, PCB, alquilfenóis e seus subprodutos, HAP, ftalatos, bisfenol a, entre outros;
- ✚ Sustâncias naturais, como fitoestrogênios. Derivam destas, substâncias como a genisteína e metaresinol e os estrogênios naturais 17β -estradiol, estrona e estriol;
- ✚ Compostos farmacêuticos, como o DES e o 17α -etinilestradiol.

Como no Brasil os serviços de coleta e tratamento de água e esgoto ainda são precários e as atividades agrícolas intensas, grande parte destas substâncias atingem e estão presentes nos corpos d'água e em receptores de esgoto, inclusive mananciais utilizados para abastecimento público. A Figura 3.1 mostra as rotas de transportes dos contaminantes orgânicos aos mananciais de água.

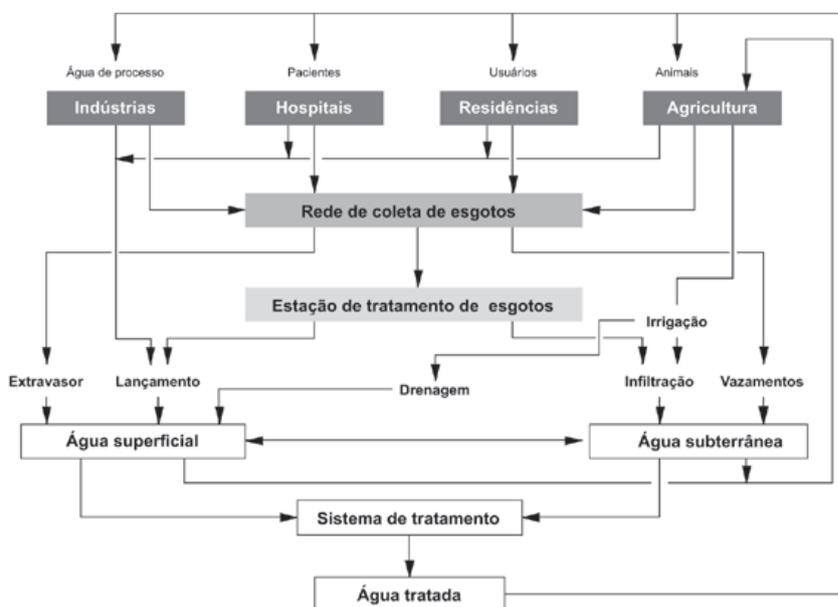


Figura 3.1 – Rota de transportes de contaminantes
Fonte: Aquino, *et al.*, 2009.

3.3 Disruptores endócrinos

O DES (dietilestilbestrol), um estrogênio sintético, foi muito usado entre os anos 50 e 70 por mulheres para prevenir o aborto espontâneo. Verificou-se mais tarde, a grande incidência de câncer vaginal, infertilidade e deformações em útero de filhas nascidas de mães que usaram esta substância. Já as crianças do sexo masculino, muitas nasceram portadores da criptorquidia, ausência de testículo (COLBORN *et al*, 2002 *apud* SOUZA 2011). O período de desenvolvimento fetal constitui uma fase muito crítica à exposição de desreguladores endócrinos. Além disso, conforme um estudo publicado na Dinamarca (CARLSEN *et al*; 1992 *apud* Bila, 2005), a quantidade de sêmen do homem diminuiu consideravelmente durante os últimos 50 anos. Foram identificadas anomalias reprodutivas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano) e seu metabólico DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno) (GUUILLETTE *et al*, 1996).

Os efeitos relatados a curto, médio e longo prazo do DES têm servido como exemplo e de padrão comparativo para os efeitos da exposição de seres humanos aos disruptores endócrinos. Não existe relato documental, anteriormente, de câncer provocado em filhos devido à administração de alguma substância química (BILA, 2005).

3.4 Ocorrências de fármacos, metabólicos e disruptores endócrinos no meio ambiente.

Diversas substâncias disruptoras endócrinas estão presentes em fármacos e produtos de higiene pessoal, tanto de uso veterinário como em seres humanos e plantas - drogas quimioterápicas, anti-inflamatórios não esteroidais, agentes utilizados em diagnósticos, meio de contrastes para raios-X, estimulantes, produtos químicos de uso diários como bloqueador solar, essências, fragrâncias, dentre outros (JORGENSEN *et al*, 1998 *apud* Bila 2005). Muitos destes compostos, denominados Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal – PFHP estão presentes no meio ambiente em baixíssimas concentrações e são bastante bioativos, alguns polares e opticamente ativos. Vários fármacos presentes em matrizes ambientais não são bioacumulativos e nem voláteis (BARRA *et al*, 2005).

O aperfeiçoamento das metodologias analíticas tem possibilitado identificação de diversos tipos de desreguladores endócrinos pertencentes a estas classes. Alguns fármacos, uma vez administrados, são completamente metabolizados dentro do organismo tornando-se

inativos. Quando excretados, principalmente através das fezes e urina, em quantidades variadas alcançam as matrizes ambientais como efluentes, as águas superficiais e subterrâneas e, menos frequentemente, a água potável, carregados através de processos de lixiviação e escoamento superficial (BILA, 2005).

A Tabela 3.1 lista os produtos fármacos mais usados e detectados em matrizes ambientais.

Tabela 3.1 - Principais aplicações dos produtos farmacêuticos e de higiene pessoal

Composto	Exemplo de PFHP	Uso Terapêutico/Cosmética
Ácido Clofíbrico	Lipofacton®, com clofibrato (Akzo Organon)	Maior metabólico do clofibrato regulador lipídico
Ácido Fenofíbrico	Lipidil®, com fenofibrato ®(Allergan Frumtost)	Maior metabólico do fenofibrato regulador lipídico
Diclofenaco	Tandrilax® (Aché), Cataflam® (Geigy), Voltarem® (Novartis)	Analgésico, antitérmico e antiinflamatório
Ibuprofeno	Algi Reumatril® (Lab. Galenogal Ltda.) Artril 300® (Farmasa), Advil® (WhiteHall)	Analgésico, antitérmico e antiinflamatório
Cafeína	Neosaldina® (Knoll)	Estimulante, atua no SNC
Ácido Acetilsalicílico	Aspirina® (Bayer), AAS® (Sanofi-Synthalabo)	Analgésico, antitérmico e antiinflamatório
Paracetamol	Tylenol® (Jansen-Cilag), Tandrilax® (Aché) Resfenol® (Lab. Galenogal Ltda)	Analgésico e antitérmico
Dipirona	Neosaldina® (Knoll), Lisador® (Farmasa) Novalgina® (Hoechst)	Analgésico, antitérmico e antiinflamatório não esteroideal
Fluoxetina	Prozac® (Lilly), Foxetina® (Gador)	Antidepressivo e contra bulimia

Triclosan	Sapoderm® (Reckit & Colman), Gamofen® (Johnson & Johnson)	Bactericida, anti-séptico e preservante em cosmética
Metoxicinamato de Etilxila	Sundown® (Johnson & Johnson)	Bloqueador solar

Fonte: Ghiselli, 2006

Os reguladores lipídicos, a cafeína e o ibuprofeno constituem algumas das substâncias PFHP mais utilizadas no mundo inteiro. Podem ser encontradas formas enantioméricas do ibuprofeno com elevado potencial tóxico para organismos aquáticos, incluindo a possibilidade de desregulação no sistema endócrino. A cafeína, presente em produtos alimentícios (café, chá, erva-mate, pó de guaraná, refrigerantes, condimentos, dentre outros), no tabaco, e em alguns medicamentos, chega às águas naturais principalmente por ação antrópica. Sua presença tem sido associada às elevadas concentrações de nitrato. Algumas pesquisas têm demonstrado que a cafeína não é totalmente absorvida pelo organismo sendo, portanto, excretada na urina. Grande variedade de resíduos alimentares e industriais contendo PFHP é descartada na rede de esgoto, muitos destas substâncias são persistentes e altamente estáveis sob condições de operação utilizadas nas ETE (Ghiselli, 2006; Chen, 2002; Kolpin *et al.*, 2002). A Figura 3.2 representa fórmulas estruturais de alguns PFHP.

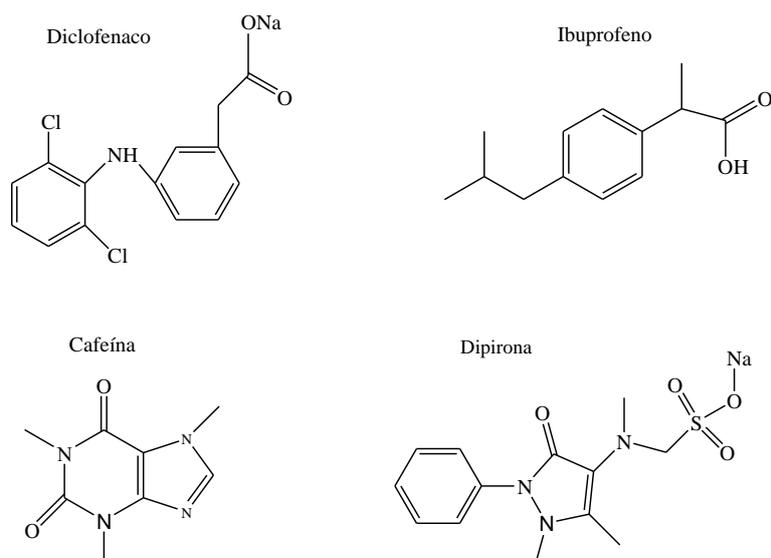


Figura 3.2 - Fórmulas estruturais de alguns PFHP

Fonte: Ghiselli (2006)

3.5 Os disruptores endócrinos e a legislação brasileira

Conforme a Resolução Conama nº 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005), os corpos d'água devem apresentar padrões de qualidade compatíveis com os usos previstos. São definidos limites de concentrações para diversas substâncias químicas proibindo o lançamento em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida. A norma faz menção a 54 substâncias e compostos, principalmente agroquímicos e solventes orgânicos, dos quais já foram publicados inúmeros estudos sobre seu potencial de desregulação endócrina. Em contrapartida, os hormônios naturais e sintéticos ainda não foram contemplados pela resolução.

A Portaria nº 2914/2011 se baseou nas diretrizes definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e aborda principalmente substâncias inorgânicas e orgânicas focada nos agrotóxicos.

Espera-se que, durante a próxima revisão das normas que regulamentam o uso da água no território nacional, esta nova classe de substâncias – disruptores endócrinos - responsáveis por provocar alterações no sistema endócrino e ocasionar o desencadeamento de diversas anomalias e doenças, seja abordada, tanto pela Resolução nº 357 do Conama quanto pela Portaria nº 2914.

3.6 Mecanismos de ação dos disruptores endócrinos

Nos itens a seguir serão descritas as características do sistema endócrino humano e os efeitos dos disruptores endócrinos.

3.6.1 Sistema endócrino

O sistema endócrino é um dos mais complexos sistemas do corpo humano. Ele é formado por um conjunto de glândulas endócrinas localizadas em diferentes partes do organismo e que apresentam como características a capacidade de produzir e secretar substâncias químicas denominadas hormônios. O sistema coordena e regula, através dos hormônios, a

comunicação entre células sendo, portanto, responsável por processos vitais do organismo como velocidade das reações químicas, permeabilidade das membranas celulares, níveis de composição do sangue e pressão sanguínea, características sexuais primárias e secundárias, manutenção da homeostase, dentre outros (Birket e Lester, 2003 *apud* OTOMO, 2010; Lintelmann *et al.*, 2003).

Os hormônios atuam como mensageiros: eles são produzidos e excretados pelas glândulas endócrinas e transportados através da corrente sanguínea ligando-se a receptores específicos e modificando seu funcionamento. Tais substâncias exercem importante papel sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e imunológico. Quaisquer transtornos provocados nestes estímulos podem causar graves consequências ao indivíduo (Otomo, 2010). Certos compostos químicos podem, também, ligar-se ao receptor hormonal e, conseqüentemente, mimetizar ou bloquear a ação do próprio hormônio (Ghiselli, 2007).

Os principais órgãos do sistema endócrino, conforme pode ser observado, ver Figura 3.3, são o hipotálamo, a hipófise, a tireoide, as paratireoides, as adrenais, o pâncreas, os testículos e os ovários.

Segundo relatado por Ghiselli (2006) o hipotálamo secreta hormônios após complexos e sucessivos processos bioquímicos que controlam a liberação de outros hormônios pela glândula pituitária. Os hormônios produzidos são transportados pela corrente sanguínea até tecidos-alvos, iniciando uma mudança na atividade celular nos seus receptores. Dependendo do tipo de mudança, essa atividade é transmitida por várias vias metabólicas. Estes diferentes processos fisiológicos são controlados por mecanismos complexos que são ativados e desativados de acordo com os níveis dos hormônios encontrados no organismo. Embora muitas destas vias metabólicas possam ser influenciadas por estimulações externas ao organismo, estudos ecotoxicológicos têm demonstrado que a grande maioria dos distúrbios endócrinos observados e explicados até o momento é atribuída ao funcionamento das gônadas, responsáveis pelas características sexuais secundárias e pelo desenvolvimento e funcionamento dos órgãos sexuais (Barra *et al* 2005 e Greim, 2004).

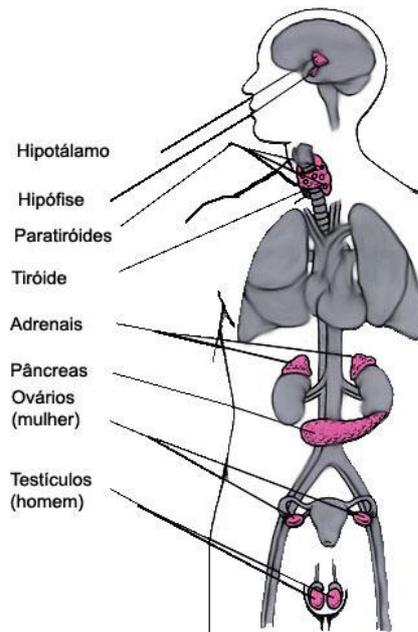


Figura 3.3 - Principais glândulas endócrinas

Fonte: Berkow et al. 2008 *apud* Bianchetti, 2008.

O hipotálamo é uma região que produz hormônios, os quais serão armazenados e liberados pela hipófise ou irão controlar a produção e liberação de outros hormônios pela mesma. A hipófise é a principal glândula do sistema endócrino. Ela divide-se em duas partes com diferentes funções: a neuroipófise que armazena e libera hormônios produzidos pelo hipotálamo e a adenoipófise que produz e libera hormônios que irão estimular e controlar o funcionamento de outras glândulas endócrinas, como a tireoide, as suprarrenais e as gônadas (OTOMO, 2010).

A tireoide localiza-se na região do pescoço. Ela produz hormônios que controlam o metabolismo, estimula a deposição de cálcio e diminui sua concentração no sangue. As paratireoides secretam o hormônio responsável pela liberação de cálcio depositado nos ossos e aumenta sua concentração no sangue. O sincronismo entre estas duas glândulas mantém o nível normal de cálcio no organismo. Pela distribuição de nutrientes e transporte de glóbulos brancos, fica o timo associado ao sistema linfático (Amabis e Martho, 2007 e Lintelmann *et al.*, 2003).

As suprarrenais ou adrenais, localizam-se uma sobre cada rim. São responsáveis por secretar os hormônios: adrenalina, que prepara o corpo para uma situação de perigo ou estresse, e a noradrenalina, responsável por manter a pressão sanguínea em níveis normais. O córtex é o responsável pela produção de hormônios corticoides como a aldosterona, que mantém o equilíbrio de água e íons K^+ e Na^+ nos rins, e os glicocorticoides que aceleram o metabolismo e atuam no armazenamento dos açúcares, proteínas e gorduras, bem como auxiliam a produção de hormônios sexuais (Amabis e Martho, 2007).

O pâncreas atua como uma glândula exócrina produzindo vários sucos digestivos ricos em enzimas quanto endócrinas. Nestas últimas, o pâncreas é constituído por aglomerados celulares denominados ilhotas de Langherans, onde são produzidos os hormônios insulina e glucagon, responsáveis por controlar o nível de glicose no sangue (Amabis e Martho, 2007).

Os hormônios sexuais masculinos e femininos são produzidos pelas gônadas. Estes atuam no crescimento e desenvolvimento do corpo, controlando ainda, o ciclo reprodutivo e o comportamento sexual.

Os testículos são as glândulas responsáveis pela produção de espermatozoides e dos hormônios sexuais masculinos - androgênios. A hipófise produz os hormônios folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), responsáveis pelas mudanças psíquicas e fisiológicas na puberdade. Controlam a produção de espermatozoides que, são produzidos durante toda a vida. Estes, quando não são liberados, morrem e são reabsorvidos pelo organismo. A testosterona e diidrotestosterona são os principais tipos de andrógenos responsáveis pelo desenvolvimento e a diferenciação dos órgãos reprodutores masculinos antes e depois do nascimento. Na fase adulta, a testosterona é essencial na produção de esperma.

Os ovários são as gônadas femininas responsáveis por produzir o óvulo e, após seu amadurecimento, expeli-lo. Produzem hormônios sexuais que regulam a ovulação e o ciclo menstrual, garantem a manutenção da gravidez e são os responsáveis pelo desenvolvimento das características femininas manifestadas pelo crescimento dos órgãos reprodutivos. Os hormônios folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), os estrogênios e a progesterona controlam o ciclo menstrual e auxiliam o desenvolvimento do embrião.

3.6.2 Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos

Nos seres humanos existem 50 tipos de hormônios que se diferenciam pelas suas estruturas, pelo modo de ação e pelo tipo de resposta que desencadeiam. Um mesmo hormônio pode ser produzido por diferentes glândulas. É o que ocorre com os estrogênios que podem ser liberados tanto pelos ovários quanto pelas glândulas suprarrenais. Um hormônio pode apresentar diferentes efeitos dependendo da localização da célula alvo, do gênero do indivíduo e da espécie. Um exemplo é o estrogênio. Liberado pelo ovário da mulher prepara o útero para o ciclo menstrual, enquanto o mesmo hormônio se liga a células dos ossos fortalecendo a massa óssea. Os hormônios influenciam a expressão de gene ligando-se ao DNA no núcleo de uma célula. Ligam-se a certos genes que são pré-programados para produzir proteínas específicas capazes de dar origem a novos estímulos de crescimento, secreção, metabolismo, dentre outras.

Sem esse constante *feedback*, o corpo humano seria uma multidão de, aproximadamente, 50 trilhões de células desconexas, ao invés de um organismo integrado, operando com um roteiro único. Qualquer interferência neste sistema, extremamente balanceado, pode levar a um desenvolvimento inadequado e gerar um desequilíbrio dos processos que ali ocorrem (SOUZA, 2011). O controle hormonal começa no cérebro, intermediado pelo hipotálamo, que por meio da secreção hormonal gonadotrófica (GnRH) governa a atividade da hipófise pituitária, a qual serve como um amplificador do sinal cerebral dado pelo hormônios gonadotróficos, liberando o hormônio luteinizante (LH) e o estimulador de folículos (FSH), conforme esquematizado na Figura 3.4 Gerolin (2008).

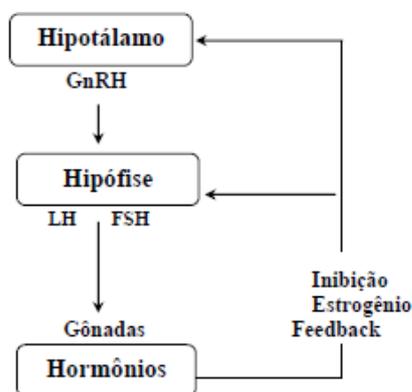


Figura 3.4 - Fluxograma do sistema reprodutor endócrino.

Fonte: Brooks, 1998 *apud* Gerolin, 2008.

O receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico produzido no organismo. Por isso, concentrações extremamente baixas de um determinado hormônio geram efeitos, produzindo uma resposta natural. Acontece que estes receptores hormonais também podem ligar-se a outros compostos químicos gerando falsos *feedbacks*. Isto explica o porquê de determinados desreguladores endócrinos presentes no organismo, mesmo em concentrações muito baixas, serem capazes de gerar uma perturbação, provocando, conseqüentemente, uma resposta (Ghiselli, 2006). A partir da Figura 3.5 é possível verificar o mecanismo de atuação do desreguladores endócrinos.

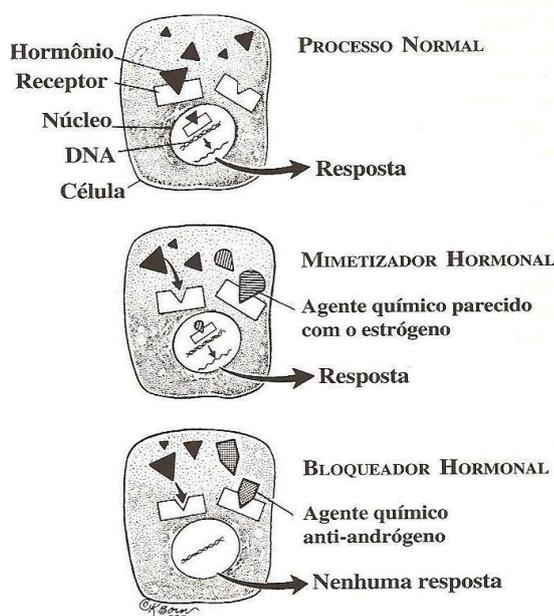


Figura 3.5 - Mecanismo de atuação do desreguladores endócrinos

Fonte: Gerolin, 2008

A capacidade de um desregulador acoplar ao receptor de um hormônio esteroide é denominada de atividade biológica. O resultado ou resposta desta ligação é, atualmente, o mais estudado (Bila, 2005). Um desregulador endócrino pode agir de várias maneiras em um receptor, provocando diferentes respostas.

Estrogênios naturais e sintéticos apresentam atividades estrogênicas que variam de cem a um milhão de vezes quando comparadas a outros desreguladores endócrinos (Tanaka *et al.*, 2001 *apud* Ferreira, 2008).

Tais estrogênios podem produzir uma resposta atuando como um mimetizador, ou seja, imitando a ação de um determinado hormônio. Este processo é denominado de agonista e

encontra-se representado na Figura 3.6. Caso nenhuma resposta seja produzida após a ligação do interferente com o receptor hormonal, ele estará agindo como um bloqueador, ou seja, estará impedindo a interação entre um hormônio natural e o seu respectivo receptor. Este processo é denominado de efeito antagonista, ver Figura a 3.6.

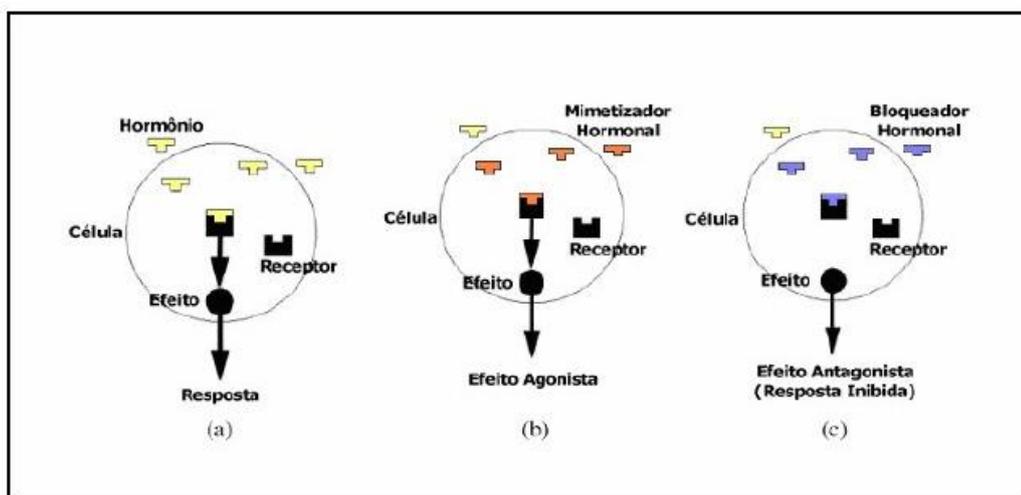


Figura 3.6 - Ação dos hormônios no sistema endócrino: (a) resposta natural; (b) efeito agonista; (c) efeito antagonista.

Fonte: Ghiselli, 2006, Bianchetti, 2008.

Outros efeitos que podem ocorrer no sistema endócrino são alterações na síntese e na remoção dos hormônios de seus respectivos receptores, bem como, interações com sistemas multi-hormonais (Ghiselli, 2007 e Birkett, 2003 *apud* Otomo, 2010).

Segundo GHISELLE (2006) muitos desreguladores endócrinos competem com o estradiol (hormônio sexual feminino produzido naturalmente pelo organismo) pelos receptores de estrogênio. Outros competem com a dihidrotestosterona (hormônio masculino produzido naturalmente pelo organismo) pelos receptores de androgênio. Estes hormônios exercem papel de feminização ou masculinização sobre o sistema endócrino. Compostos que produzem efeitos de feminização são conhecidos como estrogênicos, enquanto que os que produzem efeitos de masculinização são conhecidos como androgênicos. Assim, se um determinado composto é considerado antiandrogênico como a flutamida, ele certamente inibirá a ação biológica dos androgênicos, ligando-se e, conseqüentemente, inativando os receptores de androgênicos presentes nos tecidos-alvos. Caso determinado composto seja estrogênio como o tamoxifeno, a ação dos estrogênicos será inibida. Os receptores de estrogênicos presentes nos tecidos-alvos serão inativados.

A Tabela 3.2 apresenta diferentes mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos. A ação pode ocorrer por meio de bloqueio, pela mimetização, estimulação ou inibição dos hormônios naturais.

Tabela 3.2 - Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos

Mecanismo de ação	Definição	Efeito
Mimetização (Agonista)	Desregulador hormonal liga-se ao receptor de hormônio.	São enviadas mensagens aos genes receptores no momento impróprio ou superprodução de mensagens gerando efeitos adversos nas funções biológicas.
Bloqueio (Antagonista)	Alguns desreguladores endócrinos são capazes ocupar o sítio de ligação do receptor hormonal, bloqueando a ligação com hormônio natural.	Dependendo do tipo de desregulador, o hormônio pode ter sua atividade inibida ou ainda potencializada. Alguns pesticidas - o DDT, por exemplo - tem ação androgênica, isto é, impede a ação do hormônio masculino andrógeno.
Depleção de hormônios	Acelera a clivagem e eliminação de um hormônio.	A dioxina e alguns PCB atuam desta forma, causando diminuição dos hormônios das tireoides, insulina e andrógenos.
Estimular	Estimulam a formação de mais receptores de hormônios dentro da célula, gerando múltiplos sinais.	Promove ampliação resposta tanto do hormônio natural quanto do desregulador.
Inibição de enzimas	Interferência com as enzimas que são responsáveis pela ruptura de hormônios no corpo.	A desativação de enzimas necessárias para eliminação de hormônios faz com que permaneçam excessos destes no interior das células podendo provocar hiperestimulação dos receptores pelos hormônios naturais que não são metabolizados e permanecem no corpo.
Destruição	O hormônio pode sofrer alterações na sua estrutura química dificultando sua interação com o sítio do receptor e, conseqüentemente, ter, tanto suas propriedades quanto suas funcionalidades afetadas.	A destruição de determinados hormônios provoca um “desbalanceamento hormonal”, o que resulta em maiores concentrações de um determinado hormônio e diminuição da atividade dos hormônios naturais afetados. Por exemplo, pode haver a redução do nível de testosterona e, conseqüentemente, o nível de estrogênio ficará acima. Exemplo disso é a feminização de peixes machos.

Fonte: Gerolin, 2008.

3.7 Efeitos provocados por disruptores endócrinos na saúde humana

A estrogenicidade de compostos estrogênicos avaliados isoladamente não é suficiente para relacioná-los aos possíveis efeitos destas substâncias ao organismo humano. As pessoas estão expostas a diversas misturas de desreguladores endócrinos que interagem entre si de modo a aumentar o potencial resultante. O tempo e o período de exposição aos disruptores determinam a gravidade do dano, bem como, a maturidade deste organismo (Altenburger, 1998; Ferreira, 2008)

Diversas substâncias químicas são suspeitas de causar efeitos adversos à saúde humana, resultando em alterações no sistema endócrino, incluindo efeitos no sistema reprodutivo humano. Dentre as anomalias mais recorrentes podem ser citadas: diferenciação sexual, aumento do risco de câncer de próstata, testicular, de mama e vagina, endometriose, ovários policísticos, declínio da saúde reprodutiva, desordem neurológica, alteração das glândulas tireoide, fragilidade do sistema imunológico, redução da produção de esperma e desequilíbrios hormonais. (Otomo, 2010; Gerolin, 2008; Harrison *et al.*, 1997 *apud* Bila e Dezotti, 2007; Ahmed, 2000).

3.8 Efeitos provocados por disruptores endócrinos na saúde animal

Estudos realizados em laboratórios e em campo demonstram que compostos químicos naturais e sintéticos com função de desregulação endócrina têm alterado o funcionamento normal do sistema endócrino de peixes, répteis, pássaros e mamíferos. Existem casos de feminização de peixes machos em consequência da síntese de vitelogenina e diminuição do nível de testosterona em algumas espécies (Harrison *et al.*, 1997 *apud* Bila e Dezotti, 2007). A exposição prolongada a tais contaminantes leva a uma redução significativa na fecundidade dos descendentes (Nash *et al.*, 2004). Vitelogenina é uma lipoproteína que, em circunstâncias normais, somente é produzida no plasma sanguíneo de peixes fêmeas adultos (Nogueira, 1998 *apud* Bila e Dezotti, 2007). Segundo relatado por Jobling *et al.*, (1998) peixes machos que foram submetidos a ambientes de estação de tratamentos de esgotos, além do aumento do nível do vitelogenina desenvolveram feminização e gônadas masculinas e femininas - hermafroditismo (Ferreira, 2008).

Verificaram-se também, aumento da vitelogenina em tartarugas (Irwin *et al.*, 2001 *apud* Bila e Dezotti, 2007), além de anomalias em hormônios sexuais e morfológicas nas gônadas de jacarés (Milnes *et al.*, 2002 *apud* Bila e Dezotti, 2007).

3.9 Substâncias classificadas como disruptores endócrinos que têm recebido maior enfoque pelos pesquisadores no momento

Diversos grupos de pesquisadores estão desenvolvendo trabalhos envolvendo metodologias de análises, identificação e remoção de hormônios em matrizes ambientais, bem como os efeitos destas substâncias na fauna, na flora e principalmente sobre a saúde humana.

Os hormônios naturais e sintéticos têm sido apontados como os maiores contribuintes de desregulação endócrina, apresentando atividade estrogênica na faixa de cem a um milhão de vezes maior que a apresentada pela maioria dos compostos químicos encontrados em matrizes ambientais. Eles são capazes de alterar o funcionamento normal de um organismo mesmo em concentrações baixíssimas, da ordem de ngL^{-1} , partes por bilhão (ppb) ou parte por trilhão (ppt), enquanto a maioria das outras substâncias interferentes necessitam de concentrações em níveis de μgL^{-1} para apresentar atividade estrogênica (Bila e Dezotti, 2007; Ferreira, 2008).

A atividade estrogênica dos hormônios sintéticos é potencializada pela capacidade de acúmulo destas substâncias no solo e nos sedimentos, podendo ser facilmente transportados para outras regiões pela atmosfera e ainda acumular ao longo da cadeia trófica, expondo animais superiores a maiores riscos. Estas substâncias podem também atingir crianças durante o período de lactação, passando de mãe para filho (Ferreira, 2008).

Xenoestrogênios - hormônios presentes em diversos produtos industriais - também podem ser danosos, ainda que em menor proporção. Os fitoestrogênios são produzidos naturalmente pelas plantas, ligam-se fracamente aos receptores hormonais sendo facilmente excretados pelo organismo não representando um risco iminente para o meio ambiente, quando comparados os hormônios sintéticos (Meyer *et al.*, 1999; Ferreira, 2008).

3.10 Classificação dos disruptores endócrinos

Segundo Souza (2011), os compostos com ação de disrupção endócrina podem ser agrupados, simplificadaamente, em duas categorias.

3.10.1 Naturais

Incluem os hormônios naturais femininos (estrógenos e progestógenos), masculinos (andrógenos – testosterona), hormônios vegetais (fitoesteróides), compostos presentes em certas plantas como nas sementes de soja e que apresentam algumas propriedades semelhantes aos esteróides hormonais quando ingeridos por um determinado organismo (Ghiselli, 2006).

3.10.2 Sintéticos ou de origem antrópica

Incluem os fármacos - hormônios sintéticos (idênticos aos naturais utilizados em contraceptivos, tratamento de reposição hormonal ou drogas de aplicação veterinária), os xenoestrogênios (produzidos para a utilização nas indústrias, na agricultura e para os bens de consumo). Pertencem também a este grupo os pesticidas, aditivos plásticos - ftalatos-, compostos organoestanho, alquifenóis, bifenilas policloradas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, retardantes de chama, dioxinas, furanos, dentre outros (Ghiselli, 2006; Ghiselli, 2007).

Os compostos de origem antrópica são os que mais causam ações danosas nos organismos dos seres humanos e animais. Tais substâncias são designadas de xenoestrógenos, sintetizadas pelo homem, não apresentam estrutura química semelhante aos esteróides, mas possuem mecanismo de ação igual aos estrogênios endógenos (Goloubkova e Spritzer, 2000; Souza, 2011).

Os disruptores endócrinos estão também dentro de outras classificações de compostos orgânicos potencialmente tóxicos como (Baird, 2002; Almeida, 2003 Ghiselli, 2006):

- ✚ micropoluentes orgânicos;
- ✚ substâncias tóxicas persistentes (STP);
- ✚ poluentes orgânicos persistentes (POP);
- ✚ poluentes emergentes, etc.

Segundo (Ghiselli, 2006), esteróides compreendem um imenso grupo de compostos como os hormônios e seus precursores, frequentemente detectados em materiais

biológicos como sangue e urina. Podendo ainda ser divididos em três principais grupos:

- ✚ esteróides hormonais como androgênios (testosterona), corticoides, estrogênios e progestógenos;
- ✚ colesterol e derivados;
- ✚ fitoesteróides.

O estrogênio natural 17β -estradiol (E2) – secretado pelo ovário - é o principal estrógeno; estrona (E1) – pequena quantidade, mais fraco que o estradiol, estriol (E3), estrógeno fraco e o sintético 17α -etinilestradiol (EE2), desenvolvidos para uso médico em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos, são os que despertam maior preocupação, tanto pela sua potência, como pela quantidade continuamente introduzida no ambiente.

Os estrogênios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores intracelulares, resultando em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição de efluentes.

Conforme pode ser observado na Tabela 3.3, os estrogênios apresentam estruturas policíclicas, com um grupo hidroxila (-OH) em C_3 , um grupo metila (-CH₃) no carbono C_{13} e diferentes substituintes no C_{17} .

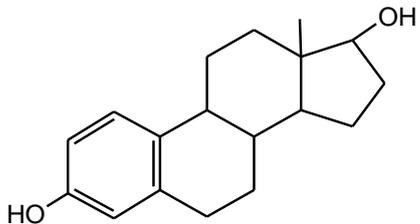
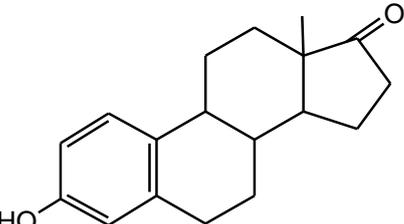
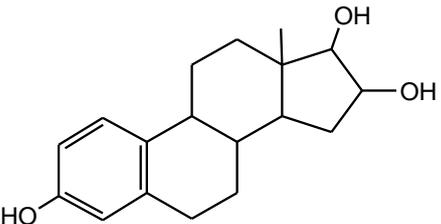
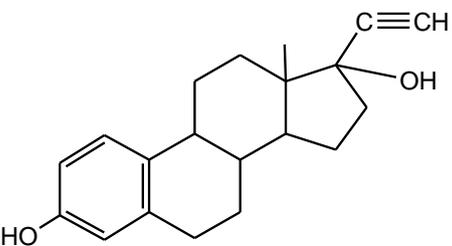
Os hormônios esteróides constituem um grupo de compostos biologicamente ativos que são sintetizados a partir do colesterol e têm, em comum, uma estrutura de três anéis hexagonais e um anel pentagonal. Os estrogênios são caracterizados por seu anel fenólico, o qual tem um grupo hidroxila responsável pela atividade biológica, isto é, a atividade estrogênica. As estruturas químicas dos estrogênios 17β -estradiol, estrona, estriol e 17α -estradiol e do colesterol são mostradas na Tabela 3.3.

Vários organismos excretam diferentes quantidades de esteróides sexuais. A produção de estrogênios por homens e mulheres varia em função de fatores como gênero, idade e ciclo reprodutivo. A quantidade de estrogênio excretada por uma mulher grávida pode ser até mil vezes maiores do que a de uma mulher em atividade normal, dependendo do estágio da gravidez. Johnson *et al.* (2000), Ferreira (2008) fizeram estimativas das concentrações de

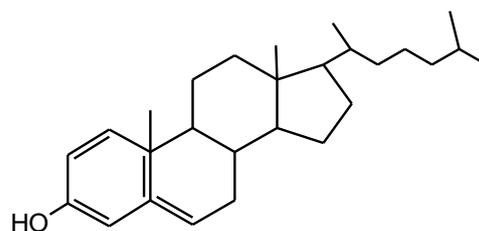
17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol estrona e estriol descartadas no ambiente por homens e mulheres conforme pode ser verificado na Tabela 3.4.

Ferreira (2008) recomenda que estas informações devem ser analisadas com certo cuidado uma vez que existem incertezas em relação à estrutura da população e aos valores de excreção destes compostos pelo organismo. Segundo Bila (2005) os estrogênios excretados por humanos apresentam baixa atividade biológica por estar numa forma conjugado. No meio ambiente microrganismos promovem a inatividade destes compostos aumentando sua estrogenicidade.

Tabela 3.3 - Estruturas químicas dos estrogênios 17 β -estradiol, estrona, estriol e 17 α -estradiol e do colesterol.

Composto	Estrutura Química
17 β -Estradiol E2	
Estrona E1	
Estriol E3	
17 α -Etinilestradiol EE2	

Colesterol



Fonte: Ferreira, 2008.

Tabela 3.4 - Excreção diária (μg) per capita de estrogênios por humanos

	17 β -estradiol	Estrona	Estriol	17 α -etinilestradiol
Homens	1,6	3,9	1,5	
Mulheres na fase fértil (15 a 59 anos)	3,5	8,0	4,8	
Mulheres na menopausa (acima de 59 anos)	2,3	4,0	1,0	
Gestantes	259,0	600,0	6000,0	
Mulheres que tomam contraceptivos				35,0

Fonte: Johnson et al., 2000.

3.11 Propriedades físico-químicas dos estrogênios

É importante conhecer as características dos estrogênios para saber quais as rotas que serão utilizadas por estas substâncias no meio ambiente e também os métodos que serão utilizados para sua determinação analítica (Cordeiro, 2009).

Os estrogênios são compostos orgânicos hidrofóbicos que podem ser retidos na camada lipídica das células presentes no lodo biológico, ocasionando assim, a bioacumulação de tais substâncias. Apresentam baixos valores de pressão de vapor, o que indica a baixa volatilidade desses compostos, são poucos solúveis e de fácil adsorção por sedimentos e partículas sólidas (Ying, 2002; Ferreira, 2008).

Segundo Souza (2011), o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é uma grandeza que mede a hidrofobicidade da molécula como um todo. Substâncias hidrofóbicas apresentam

K_{ow} maior que 2. É considerado o parâmetro mais importante em estudos de permeação e de relações estrutura/atividade. Por meio do coeficiente de partição (K_{oc}) pode-se determinar a adsorção da substância ao material em suspensão na água, sendo este valor crescente com o aumento do caráter apolar do composto. Deve-se levar em conta a pressão de vapor para ter uma ideia sobre a magnitude das ligações intermoleculares formadas por estes compostos

A Tabela 3.5- resume algumas propriedades físico químicas dos estrogênios mais comuns.

Tabela 3.5 - Propriedades físico-químicas dos estrogênios

Propriedades	Estrogênios			
	Estrona	Estriol	17 β -estradiol	17 α -etinilestradiol
Massa Molar (g/mol)	270,37	288,4	272,39	296,4
Solubilidade na água (mg/L)	13	13	13	4,8
Pressão de Vapor (mmHg)	$2,3 \times 10^{-10}$	$6,7 \times 10^{-15}$	$2,3 \times 10^{-10}$	$4,5 \times 10^{-10}$
Log K_{ow}	3,43	2,81	3,94	4,15
K_{oc}	4882	1944	3300	4770

Fonte: Bila, (2005 adaptada).

Áreas onde foram aplicados biossólidos ou excretas de animais apresentam sérios riscos de contaminação, uma vez que, a presença de baixíssimas concentrações destes poluentes é capaz de desencadear alterações no organismo.

Os corpos d'água podem ser facilmente atingidos por estes hormônios, por escoamento superficial. O lançamento contínuo destas substâncias no meio ambiente, aliado a efeitos bioacumulativos e persistentes, expõe a fauna, a flora e seres humanos a riscos podendo desenvolver graves doenças.

3.12 Rota dos esteróides no organismo

Estrona, 17 β -estradiol e estriol são estrogênios naturais excretados diariamente na urina de mulheres, animais fêmeas e, em menor, quantidade por homens. O17 β -estradiol é

rapidamente oxidado à estrona, que pode ser convertido em estriol, que é o produto de excreção. Outros metabólicos polares podem ser formados e estar presentes na urina e nas fezes (Bila, 2005; Otomo, 2010)

Segundo Otomo (2010), em organismos de humanos e animais, principalmente no fígado, os estrógenos passam por diversos processos bioquímicos como, oxidação, hidrólise, desoxigenação e metilação, antes da conjugação com glicuronídeo e sulfato que tornam estas substâncias inativas. Na forma conjugada, os estrogênios apresentam menor atividade biológica, ou seja, são menos reativos.

Nas estações de tratamento de esgoto o efeito protetor do sulfato e glicuronídeo, conferido aos estrogênios, pode ser removido por ação de bactérias como a *Escherichia coli*. Esta é eliminada em largas quantidades nas fezes e, em grande número é capaz de sintetizar grandes quantidades da enzima β -glucuronidase, que podem ser responsáveis por esta transformação. Tais compostos voltam a desenvolver atividade estrogênica. Ao alcançar os corpos d'água podem exercer influências no sistema reprodutivo de peixes e outros organismos aquáticos em concentrações mínimas (Ternes *et al.*, 2000 *apud* Bila, 2005).

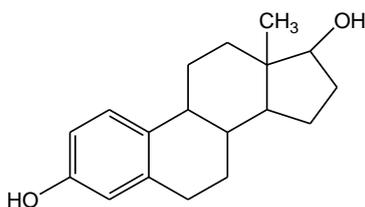
3.12.1 17 β -estradiol

O 17 β -estradiol é o principal estrogênio humano. Ele é utilizado como padrão positivo na medida da atividade estrogênica por ensaios *in vivo* e *in vitro* para avaliar a atividade estrogênica das substâncias químicas simples ou amostras composta. No organismo ele é rapidamente oxidado a estrona, que pode ser convertido em estriol, sendo este o maior produto da excreção. Outros subprodutos polares também podem ser excretados junto à urina ou fezes (Ying, 2002; Ferreira, 2008; Laudicéia, 2010)

O anel fenólico, grupamento polar capaz de fazer ligação de hidrogênio, ver Figura 3.7, é responsável pela alta afinidade em ligar-se ao receptor de estrogênios e fornecer a resposta estrogênica (Bila, 2005; Ferreira, 2008).

Figura 3.7 - Estrutura química do 17 β -estradiol

Fonte: Bila, 2005



Segundo Ferreira (2008), o 17 β -estradiol, em ensaios *in vitro*, apresenta elevada atividade estrogênica mesmo em baixíssimas concentrações, da ordem 10⁻⁹ M, Este hormônio é responsável pela formação das características femininas e interfere no comportamento sexual, no ciclo menstrual, na ovulação, além de provocar alterações na formação do tecido epitelial e da estrutura óssea, bem como interferência no funcionamento do sistema cardiovascular, da memória e do sistema imunológico.

3.12.2 17 α – etinilestradiol

O 17 α – etinilestradiol é um estrogênio sintético, encontrado principalmente em pílulas anticoncepcionais e nas terapias de reposição hormonal. Por apresentar baixa biodegradabilidade, devida à presença do grupo etinil na estrutura, e alta estrogenicidade o 17 α – etinilestradiol, constitui importante desregulador endócrino presente no ambiente aquático (Johnson *et al.*, 2000; Ferreira, 2008).

Os estrogênios sintéticos apresentam maior estabilidade em água que os estrogênios naturais, além de apresentar maior potencial estrogênico. O 17 α – etinilestradiol é o estrogênio mais potente para os peixes (Liu e Liu, 2004).

Conforme pode ser observado na Figura 3.8, a estrutura do 17 α – etinilestradiol difere do 17 β -estradiol apenas pela presença do grupo etinil no anel de cinco membros, responsável pela resistência deste composto à ação de microrganismos decompositores. O grupo fenólico, responsável pela ligação com os receptores hormonais, faz-se presente em ambas as estruturas.

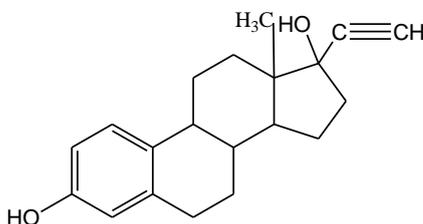


Figura 3.8 - Estrutura química do 17 α – etinilestradiol

Fonte: Bila, 2005

3.12.3 Contaminação de mananciais por estrogênio

Diversos países têm se preocupado com a presença de substância com função de disruptor endócrino no organismo. Estes compostos são largamente encontrados em afluentes e efluentes de estações de esgotos, lodo biológico da estação de tratamento de esgoto, em sedimentos marinhos e solos e águas superficiais, subterrâneas e potáveis. Lodos de estações de tratamento de esgoto tratado por digestão anaeróbia constituem importante fonte de contaminação de solos de agricultura (Ferreira, 2008). Estudos feitos por Ternes *et al* 2002 *apud* Bila, 2005) para verificar a eficiência do processo de tratamento por digestão anaeróbia na remoção de estrógenos identificaram elevadas concentrações de estrona, 17 β -estradiol, e 17 α -etinilestradiol, sendo 37ng/g, 49 ng/g e 17 ng/g respectivamente, indicando que o processo de tratamento utilizado é ineficiente para remoção de estrógeno do efluente.

Os corpos d'água e águas subterrâneas podem receber do solo, com muita facilidade, substâncias químicas contaminantes através de vários processos, tais como carreamento, erosão, infiltração e lixiviação. Bodzek *et al.*; 2006, encontraram, em amostras de água potável, presença dos estrógenos 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em concentrações de 2,1ng/L e 0,5ng/L, respectivamente. A Tabela 3.6 e Figura 3.10 mostram algumas fontes de hormônios e a trajetória destas até atingir a água potável.

Tabela 3.6 - Algumas fontes de hormônios

Fonte	Hormônios
Alimentos – carne, peixes, ovos, carne de porco e derivados do leite	17 β -estradiol, estrona, progesterona, testosterona
Efluentes de plantas de tratamento de efluentes	17 β -estradiol, estrona, estriol, 17 α -etinilestradiol
Lodo de estação de tratamento de esgoto	17 β -estradiol, estrona, estriol, 17 α -etinilestradiol
Pílulas anticoncepcionais	17 α -etinilestradiol, mestranol
Reposição hormonal	Estrona conjugada, 17 α e 17 β - estradiol
Resíduos agrícolas	17 β -estradiol, estrona

Fonte: Birkett e Lester, 2003 *apud* Ferreira, 2008

3.13 Áreas potencialmente críticas no Brasil

Segundo Bila e Dezoti (2007), a contaminação ambiental por disruptores endócrinos no Brasil se dá principalmente através das águas subterrâneas e superficiais, contaminadas por esgotos domésticos, efluentes de estações de tratamento de esgotos, lodo biológico, solo e sedimentos marinhos. A precariedade do saneamento básico no país, aliada ao mal uso de agrotóxicos juntamente com produtos veterinários, são os principais responsáveis pela disseminação de microrganismos patogênicos e substâncias de elevado potencial tóxico a saúde de seres humanos e animais. Sem receber o devido tratamento, o esgoto pode atingir mananciais de coleta d'água para abastecimento humano, lavouras agrícolas e o solo (IBGE, 2006). A Tabela 3.7 mostra os resultados de estudos e quantificação de estrogênios em efluentes, estações de tratamento de esgoto e corpos de águas receptoras no Brasil e em diversos países. É possível verificar a escassez de dados relativos à ocorrência de disruptores endócrinos em mananciais de abastecimento brasileiro.

Tabela 3.7 - Concentrações de substâncias estrogênicas identificadas em afluentes e efluentes de ETEs, rios e águas de abastecimento, em diversos países segundo vários autores.

Países	Estrogênios e Xenoestrogênios					Fonte
	E1	E2	E3	EE2	NF	
Reino Unido	1,4 - 76n/L	2,7 - 48ng/L		0,2 - 15ng/L	23 - 53µg/L	Desbrow-1998
					0,1-3,7µg/L 180µg/L	Johnson-2003
	6,4 - 28ng/L 0,2-8,5ng/L	1,6-7,4ng/L 0,5-7,0ng/L	2,4ng/L 1,2-3ng/L	nd		Xiao-Yao Xiao-2001
	15-220ng/L	35-308ng/L			3-10,7µg/L	Trevor-2000
Alemanha	9-7ng/L	1-20ng/L		1-4ng/L		Desbrow 1998
	70ng/L	3ng/L		15ng/L		Ternes-1999 rios e efluentes - ETE
	0,7-1,6ng/L	nd		nd		
	2,3ng/L	0,8-2,9ng/L	3,0ng/L			Shore-2003
E.U.A		25ng/L		2000ng/L	0,1µg/L	Desbrow-1998
	27ng/L	9ng/L	19ng/L	73ng/L	0,8-40µg/L	Kolpin-2002
					0,201µg/L	Feerguson-2000
		0,2-2,6ng/L		0,2-0,5ng/L	0,1-1,2µg/L	Snyder-1999
		0,7-3,7ng/L		0,2-0,7ng/L	0,2-3,6µg/L	
	2,7ng/L	0,4-3,5ng/L	0,5-11ng/L	0,3-1,7ng/L		Baronti-2000
	25-132ng/L	4-22ng/L	24-188ng/L	0,5-13ng/L		
					0,1-3,7µg/L	Johnson-2003
	0,5-52ng/L	0,5-6ng/L	0,7-28ng/L	0,5-2,2ng/L	Johnson, Belfroid 2000-ETE	
	0,5-75ng/L	0,5-20ng/L	2-120ng/l	0,5-10ng/L		
Canadá	48ng/L	64ng/L		42ng/L		Ternes-1999
Brasil	40ng/L	20ng/L		6ng/L	1,39µg/L	Ghiselli-2006
	4,13µg/L	5,56µg/L		5,04µg/L	1,87µg/L	
	4,8µg/L	6,69µg/L		5,81µg/L	<1,5µg/L	
	5µg/L	1,9-3µg/L		1,2-1,7µg/L	<1,5µg/L	
Espanha	6-343µg/L				0,5-664µg/L	Solé-2000
Holanda	4,5ng/L	0,9ng/L				Belfroid-1999

	0,4-47ng/L 18-140ng/L	0,7-12ng/L 9-48ng/L	0,2-1,8ng/L 1,5-8,8ng/L		nd	Johnson, Belfroid- 2000
Taiwan					1,6µg/L 0,6-3,0µg/L	Ding-2001
Austrália	54ng/L	14ng/L		<5,0ng/L		Braga-2005

Fonte: Adaptado de Gerolin, 2008.

Segundo estudos do Plano Nacional De Recursos Hídricos - PNRH (2006) as águas de captação de bacias hidrográficas localizadas nas proximidades das regiões metropolitanas apresentam os piores índices de qualidade merecendo destaque as principais regiões metropolitanas do país (Aquino *et al*, 2009).

- ✓ Região Hidrográfica do Paraná: bacias do Alto Iguaçu (Curitiba), alto Tietê (São Paulo), Piracicaba (Campinas), Meia Ponte (Goiânia), Rio Preto (São José do Rio Preto);
- ✓ Região Hidrográfica do São Francisco: bacia do rio das Velhas, Paraná e Paraopeba (Belo Horizonte);
- ✓ Região Hidrográfica Atlântico Leste: bacia dos rios Joanes e Ipitanga (Salvador);
- ✓ Região Hidrográfica Atlântico Sul: bacia dos rios dos Sinos e Gravataí (Porto Alegre);
- ✓ Região Hidrográfica Atlântico Sudeste: bacia do rio Paraíba do Sul (Juiz de Fora), bacia do rio Jucu (Vitória).
- ✓ Região Hidrográfica do Paraguai: bacia do rio Miranda (Aquidauana - MS).

A deterioração da qualidade das águas dos mananciais próximos aos grandes centros urbanos é um processo que ocorre ao longo dos anos, fruto de ocupações urbanas sem planejamentos, onde a maioria das moradias não dispõe de coleta de esgoto adequada e, muitas das vezes, os dejetos correm a céu aberto até alcançar córregos mais próximos. Fazem todo o trajeto sem passar por qualquer processo de tratamento.

Apenas países desenvolvidos contam com programas de monitoramento de micropoluentes, como os disruptores endócrinos, presentes em águas superficiais e efluentes de estações de tratamento de esgoto.

Vale destacar a parceria formada entre pesquisadores e alunos das Universidades Federais de Minas Gerais e Ouro Preto para avaliação dos mananciais da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), e da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a avaliação dos mananciais da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP).

O estudo avalia a eficiência de algumas técnicas de tratamento (convencional, filtração direta, oxidação com cloro e ultrafiltração) na remoção de disruptores endócrinos e do desempenho de uma unidade de ultrafiltração para tratamento de água do Reservatório Guarapiranga. As substâncias investigadas são nonilfenol (4-NP), estradiol (E2) e etinilestradiol (EE2), devido à elevada estrogenicidade e grande ocorrência nos mananciais (Aquino *et al*, 2009).

Nos mananciais da RMBH foi detectada a presença dos três disruptores endócrinos monitorados, em concentrações que variaram de 40 a 1.918 ng/L para o nonilfenol, 1,5 a 36,8 ng/L para o estradiol e de 3 a 54 ng/L para o etinilestradiol.

As Figuras 3.9 e 3.10 mostram as concentrações do estradiol e etinilestradiol monitoradas ao longo de fevereiro de 2007 a janeiro de 2008 na RMBH e RMSP.

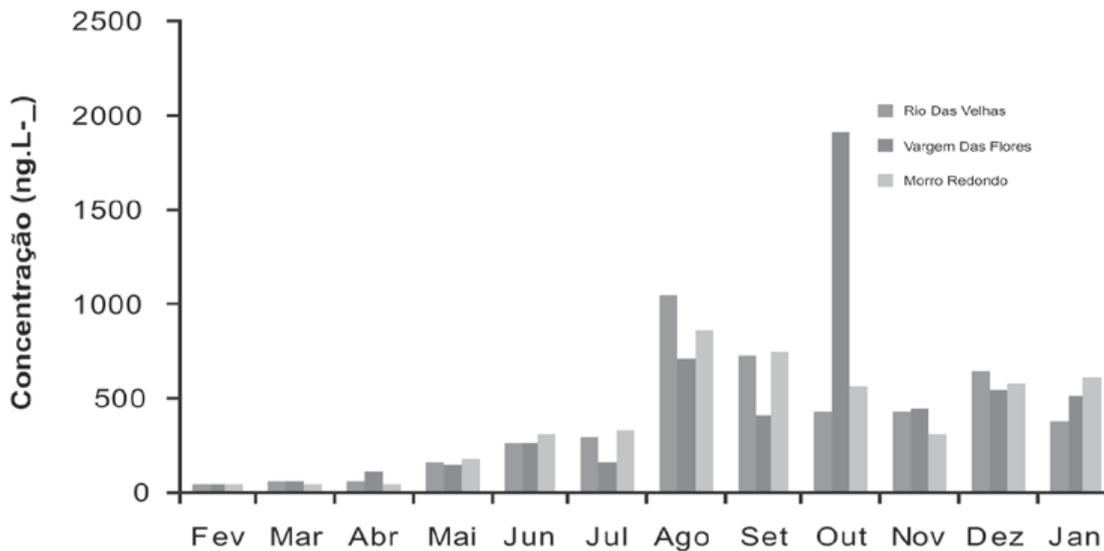


Figura 3.9 - Variações da concentração de estradiol nos três mananciais da RMBH.

Fonte: Moreira, 2008.

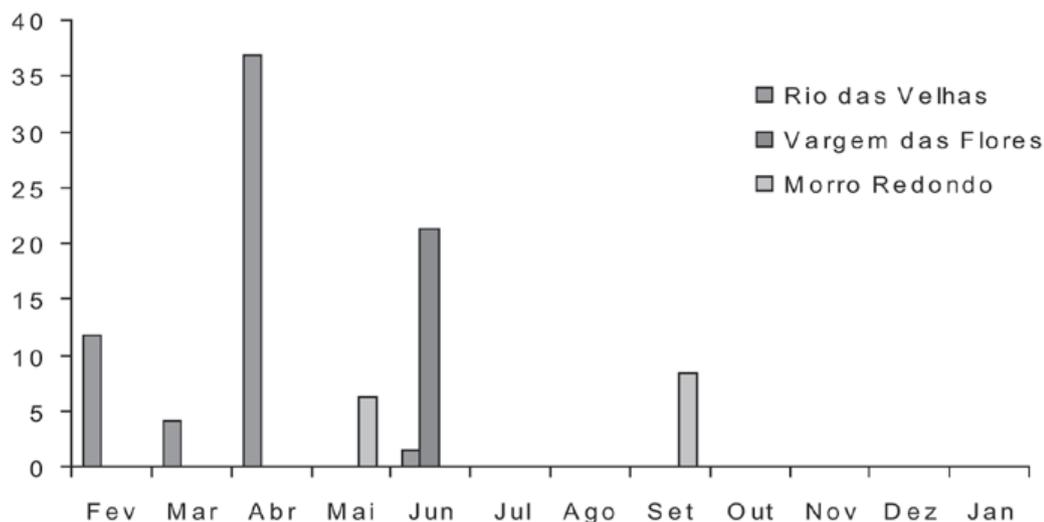


Figura: 3.10 - Variações da concentração de estriol nos três mananciais da RMSP.
 Fonte: Moreira, 2008.

Nos mananciais da RMSP, o Rio Cotia e Reservatório Billings apresentaram concentrações mais significativas de nonilfenol e estrogênios. A concentração de estrogênios variou de 0,72 a 17,1 ng/L, sendo que o etinilestradiol apresentou concentração abaixo do limite de detecção do método utilizado, que é o processo de extração em fase sólida (0,5 ng/L). Os resultados obtidos nas análises deste manancial são apresentados na Tabela 3.8.

Segundo Aquino *et al.*, (2009) em relação a análise do estradiol (RMBH) e estrogênios (RMSP) observa-se uma menor frequência de detecção, principalmente nos mananciais da RMBH. Já em relação ao etinilestradiol, sua detecção ocorreu apenas nos mananciais da RMBH. A detecção deste último é difícil e está presente sempre em menor concentração quando comparado com o estradiol e estrogênios.

Tabela 3.8 - Variações da concentração de estriol nos dois mananciais da RMSP

DATA	UNIDADE	BILLINGS	BAIXO COTIA
10/1/2008	ng/L	< 50	< 50
15/1/2008	ng/L	115	51
22/2/2008	ng/L	96	< 50
29/2/2008	ng/L	114	841
9/5/2008	ng/L	1057	NA
26/5/2008	ng/L	295	982
10/6/2008	ng/L	1168	1719
1/7/2008	ng/L	1767	2185
Mínimo		< 50	< 50
Média	ng/L	659	1156
Máximo		1767	2185
Desvio Padrão		669	826

NA - NÃO ANALISADO

Fonte: Aquino *et al.*, 2009.

4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA ANÁLISE DE ESTROGÊNIO EM MATRIZES AMBIENTAIS

A presença de desreguladores em concentrações muito pequenas, na faixa de ng/L e µg/L, requer técnicas analíticas muito avançadas para sua detecção e, por isso são um desafio para muitos pesquisadores.

Conforme relatado por Araujo (2006), até recentemente o método mais usado no preparo de amostras complexas para análises era a extração líquido-líquido. A técnica se baseia na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis. A solução é colocada em um funil de separação ao qual se adiciona um solvente orgânico imiscível, o sistema é agitado e o analito passa da fase aquosa para a orgânica, enquanto que os disruptores permanecem, na sua maioria, na fase aquosa. Esta técnica é tediosa, requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresenta custo elevado, além de ser de difícil automação, pouca repetibilidade/reprodutibilidade em decorrência das várias etapas requeridas envolvendo o analito de interesse.

Na década de 70, visando à eliminação destes problemas, um novo método foi introduzido, o qual foi denominado de extração em fase sólida (SPE).

A partir da década de 90, a cromatografia gasosa ganhou popularidade e atualmente destaca-se a utilização de técnicas cromatográficas (cromatografia líquida, LC e gasosa, GC) acopladas a sistemas de detecção de alta sensibilidade e especificidade, como espectrometria de massas (MS ou MS/MS) ou espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) com ferramentas analíticas para determinação dos Desreguladores Endócrinos (Souza, 2011).

Segundo Perovic *et al.*, (2002), Richardson (2009) mesmo as técnicas mais modernas tendo ganhado força nos últimos anos, a técnica de CG/MS tem sido a mais amplamente utilizada nas análises de disruptores endócrinos.

4.1 Extração em Fase Sólida – EFS

Segundo Gerolin (2008), a EFS é um dos instrumentos mais poderosos e mais empregados para extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas, permitindo que concentrações muito baixas sejam detectadas.

A EFS é uma técnica relativamente simples de extração e requer pequenas quantidades de solventes. Ela é mais utilizada na preparação de amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa.

Geralmente, são usados cartuchos ou discos de extração, comercialmente disponíveis, com uma variedade de adsorventes, tais como, resina de copolímero poliestireno (ENV), sílica, alumina B e os que contêm o grupo octadecilsilano (C18) quimicamente ligado a sílica. Este é um dos mais empregados, possui caráter apolar, sendo denominado, portanto, de fase reversa, onde a fase estacionária é menos polar que a fase móvel.

O cartucho é de grande aplicabilidade no caso de coleta de amostras que se encontram em local distante do laboratório analítico. Faz-se passar a água através do cartucho de forma a reter os analitos de interesse e providencia-se o transporte de forma adequada levando em consideração as propriedades físico-químicas do cartucho e do analito de interesse (Gerolin, 2008).

Os mecanismos de separação na EFS são adsorção e partição. O interessante é que produtos polares da degradação do micropoluentes orgânicos não podem ser extraídos (Gerolin, 2008; Souza, 2011).

Segundo Lanças (2004) *apud* Gerolin (2008), os principais modos de operação em EFS são: Concentração de analitos, isolamento de analitos e de matriz, além de estocagem de amostra, conforme a Figura 3.11.

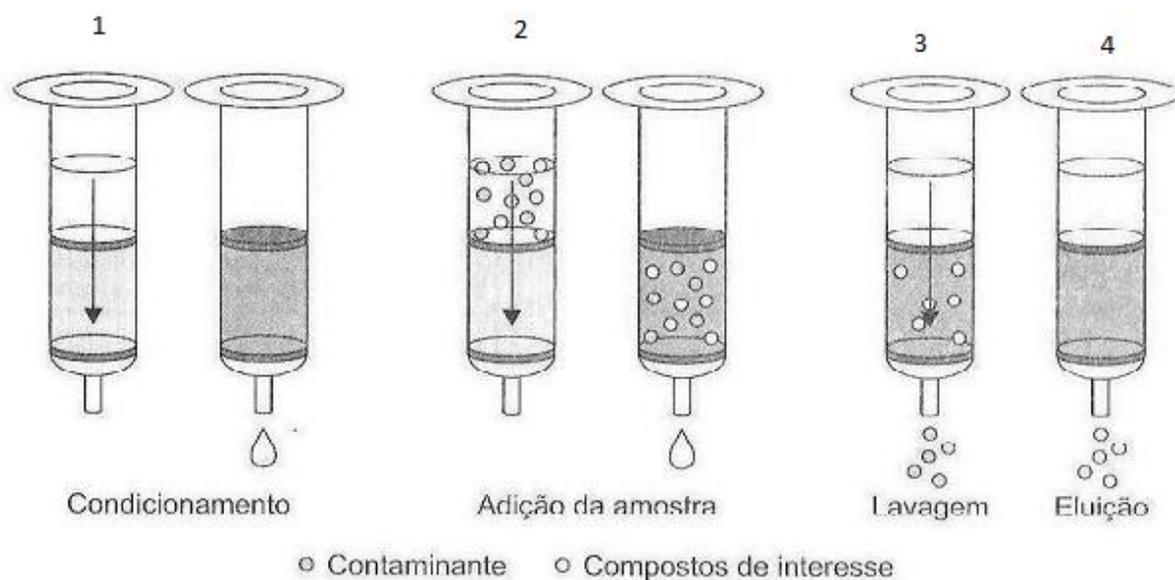


Figura 3.11 - : Etapas do procedimento de extração em fase sólida

Fonte: Gerolin, 2008

- 1- Utiliza-se solvente adequado para ativar os sítios do sorvente e ajustar as forças do solvente de eluição com o sorvente.
- 2- Adição da amostra, em que ocorre a retenção do analito e, às vezes, de algum “contaminante”.
- 3- Limpeza do cartucho, este é lavado com outro solvente para retirar os contaminantes menos retidos que o analito.
- 4- Eluição e coleta do analito.

Concentração ou enriquecimento de analito – é utilizado a fim de aumentar a concentração do disruptor endócrino na amostra. Faz-se passar grande quantidade da amostra pelo cartucho com o objetivo de aprisionar o analito, deixando passar o solvente e os “contaminantes”.

4.2 Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE

Segundo Gerolin (2008) e Otomo (2010) a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais nova e mais importante técnica de separação de componentes de uma mistura. A CLAE utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. Esta cromatografia utiliza pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Têm capacidade de realizar separações e análises quantitativas de grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. O detector é o olho do sistema cromatográfico, que mede as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra debaixo da coluna.

4.3 Espectrometria de Massas

Segundo Otomo (2010), a espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada para identificar substâncias químicas, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre a composição atômica e molecular de materiais inorgânicos e orgânicos. Os primeiros espectrômetros de massas foram desenvolvidos com base nas pesquisas pioneiras de J.J Thomson em 1912 e F.W. Aston em 1919, conforme relatado por Otomo (2010).

A espectrometria de massas baseia-se na ionização de átomos e moléculas por meio de impacto de elétrons, que são gerados pelo aquecimento de um filamento. O produto dessa interação elétron/molécula gera íons positivos em um estado eletrônico e/ou vibracional excitado, que são facilmente controlados por campos magnéticos e elétricos. O aparelho é composto por três partes: a fonte de íons, analisador de massas ou filtro de massas, o coletor de íons e um sistema de aquisição de dados que registra os sinais de abundância relativa ou intensidade de cada uma das espécies iônicas presentes.

Conforme relatado por Gerolin (2008), o espectrômetro de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial de fornecer informações de massa molar, bem como estrutura do analito. O espectrômetro de massas é baseado na produção de íons que são subsequentemente separados ou filtrados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) detectada. O resultado é um gráfico de abundância relativa dos íons produzidos em função da massa/carga (m/z).

A Figura 3.12 ilustra as etapas do funcionamento de um espectrômetro de massa.

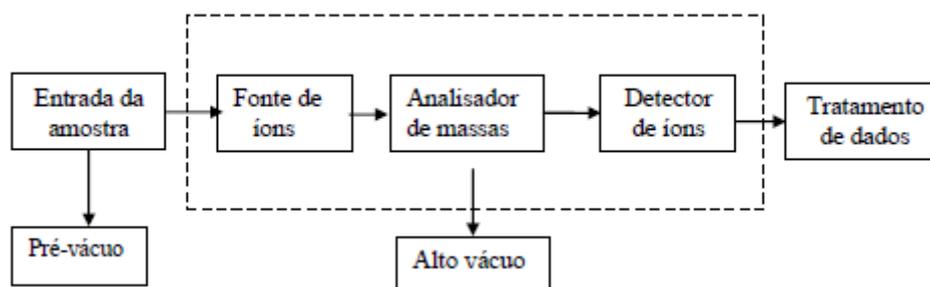


Figura 3.12 - Diagrama do princípio de operação de um espectrômetro de massa .
Fonte: Gerolin, 2008

4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Espectrômetro de Massas (EM)

Segundo NIESSEN (1999) *apud* SOUZA (2011) como vantagens do acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massas podem ser citadas, dentre outras:

- ✓ o espectrômetro de massas é um detector universal para CL;
- ✓ potencial para análise de compostos não voláteis;
- ✓ potencial para análise de compostos termolábeis;
- ✓ evita necessidade de derivação do analito;

- ✓ avaliação da pureza de picos.

A ionização de elétrons e a ionização química requerem que a amostra esteja no estado gasoso, ao passo que CL e CL/EM são especialmente indicados para analitos não voláteis, constituindo assim, bons métodos de análises para os disruptores endócrinos presentes em baixíssimas concentrações no ambiente.

5 COMPARAÇÃO ENTRE ALGUNS MÉTODOS DE REMOÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS DE ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO DOMESTÍCO

Serão analisados alguns trabalhos envolvendo a remoção de estrógenos de águas de abastecimento publicados a partir de 2005.

Conforme relatado por Bila, (2005) a ozonização tem se destacado como uma das tecnologias de maior eficiência na remoção de substâncias estrogênicas de água de abastecimento urbano.

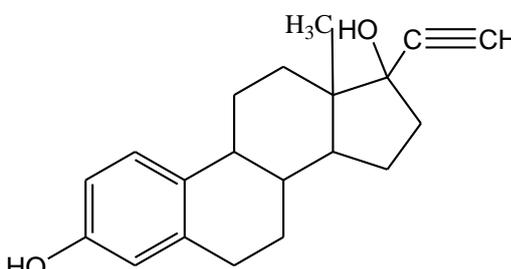
A eficiência de remoção aumenta significativamente quando o ozônio é usado juntamente com água oxigenada (O_3/H_2O_2). O efeito potencial específico dos estrogênios é a atividade estrogênica, que está intimamente ligada com a porção fenólica da estrutura química dos estrogênios. Esta parte da cadeia funciona como um centro doador de elétrons que é altamente reativo com o ozônio.

5.1 OZONIZAÇÃO

Antes de apresentar os resultados das pesquisas é preciso entender o mecanismo de ação do ozônio. Na ozonização, o ozônio molecular O_3 e radicais HO, são os principais agentes oxidantes de compostos orgânicos. A presença de umas destas espécies no meio depende do pH. O aumento de pH favorece a formação dos radicais HO, que atuam como oxidantes fortes e não seletivos reagindo rapidamente com uma variedade de compostos. Em pH menor do que 4, a oxidação via O_3 ocorre com maior frequência; o ozônio é mais seletivo e reage rapidamente com grupos específicos na molécula orgânica. Constam nos trabalhos de

Harrison (2000) *apud* Bila (2005), Huber e Von Gunten (2004) *apud* Bila (2005) que o ozônio molecular é um forte eletrófilo, altamente reativo com moléculas que apresentam sítios com alta densidade eletrônica como grupos amino, anéis aromáticos e insaturações. A remoção da atividade estrogênica do 17 β -Estradiol é facilmente obtida pelo ataque do O₃ mesmo quando usado em baixas concentrações, porém, segundo Huber *et al* (2003), o grupo etinil do 17 α -Etilestradiol apresentou reatividade muito baixa com o ozônio. A constante da taxa de reação de compostos orgânicos com ozônio (K_{O₃}) é uma grandeza que expressa a reatividade destes compostos com o ozônio, conforme indicado na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Constante da taxa de reação de compostos orgânicos com ozônio

		
	Grupo fenólico	Grupo etinil
K_{O₃}	3 x 10⁶ M⁻¹ S⁻¹	2 x 10² M⁻¹ S⁻¹

Fonte: Ferreira, 2008.

No entanto, vale ressaltar a preferência do ozônio pelo anel fenólico conforme a Figura 3.13 proposta por Huber *et al*, 2003.

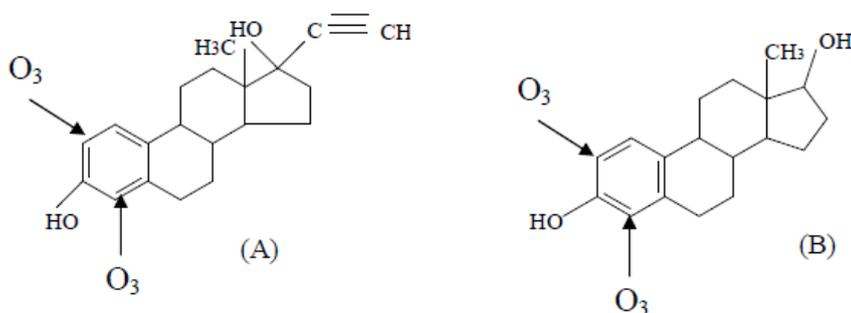


Figura 3.13 – Reatividade do ozônio com grupo fenólico estrogênio

Fonte: Huber *et al*, 2003.

Os estudos de Bila (2005) sobre degradação do 17 β -Estradiol foram realizados em três diferentes valores de pH: 3,0 ; 7,0 e 11,0 para verificar a eficiência do ozônio molecular e radical HO \cdot na inativação do anel fenólico do estrogênio a partir de soluções aquosas de concentração de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nos três valores de pH mencionados. A ozonização foi conduzida com diferentes dosagens de ozônio e pH de solução. O pH foi ajustado e a faixa de concentração de ozônio consumido usado no experimento foi de 0,5 a 30 mg.L $^{-1}$ de ozônio. A dosagem de ozônio utilizada nos experimentos significa a quantidade de ozônio consumida pela amostra, ou seja, a diferença de ozônio nas correntes gasosas de entrada e de saída da coluna de contato no tempo de ozonização. Após este processo as amostras foram tratadas de acordo com uma metodologia analítica desenvolvida para avaliar a degradação do 17 β -Estradiol.

Em meio fortemente ácido - pH 3 - o ozônio molecular O $_3$ é a principal espécie a atacar a estrutura do 17 β -Estradiol. Neste caso, o grupo fenólico da cadeia encontra-se protonado. Em meio neutro - pH 7- os dois oxidantes podem coexistir simultaneamente enquanto que, em meio fortemente básico - pH 11- a base conjugada do fenol (fenolato) é a espécie predominante do meio. Além disso, o ozônio molecular sofre decomposições em radicais secundários, onde o HO é o principal deles, sendo, portanto, o responsável por desencadear o processo oxidativo do 17 β -Estradiol.

Os bons resultados obtidos em pH alto devem-se à presença, em grande concentração, do radical HO. Sendo este mais reativo do que seletivo, oxida com maior rapidez as espécies presentes. Na Figura 3.14 estão representados os resultados no processo de ozonização da solução de 17 β -Estradiol em diferentes valores de pH.

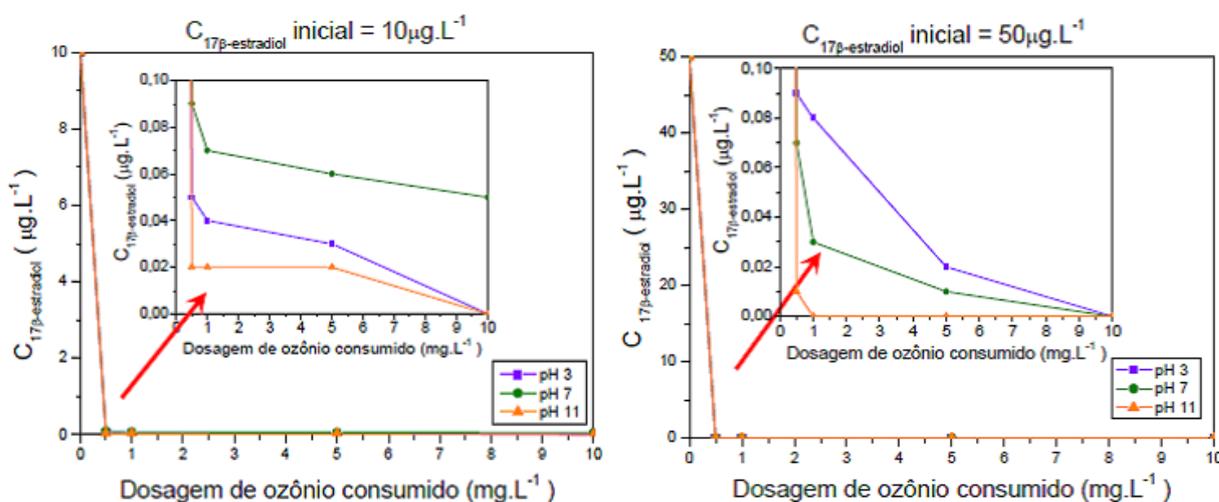


Figura 3.14 – Concentração inicial da solução de 17β-Estradiol 10 e 50 µg.L-1

Fonte: Bila, 2005.

O resultado obtido por Bila (2005) é corroborado pelos trabalhos realizados por Ferreira (2008) e Souza (2009). Estes avaliaram também a oxidação do 17β-Estradiol em função do pH, conforme a Figura 3.15.

Alum *et al.* (2004) obtiveram mais de 99 % de remoção de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol de água potável utilizando a ozonização. Ferreira (2008) realizou estudos com amostras de 17β-Estradiol e 17α-Etinilestradiol preparadas a partir da dissolução destes compostos em acetona e água ultra pura, devida sua baixa solubilidade em água, e estocadas a 4°C. Os resultados obtidos demonstraram que o processo foi efetivo tanto na remoção do 17β-Estradiol (99,7%) quanto do 17α-Etinilestradiol (98,8%), em pH 11, enquanto que em pH 3 foram praticamente 100% para o 17β-Estradiol e 99,5% para o 17α-Etinilestradiol. Os resíduos destes estrogênios presentes no meio reacional são, aproximadamente, 30 ng.L-1 de 17β-Estradiol e 120 ng.L-1 de 17α-Etinilestradiol, o que representa risco devido à sua capacidade de desregulação endócrina mesmo em concentrações baixíssimas.

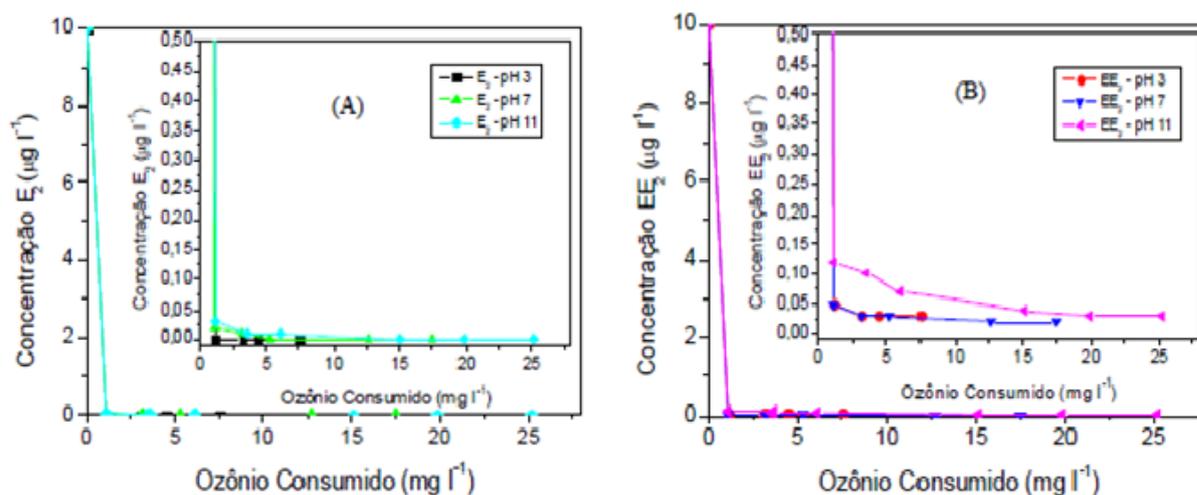


Figura 3.15 - Remoção de 17β-Estradiol e 17α-Etinilestradiol pelo processo de ozonização em pH 3, 7, 11. (Fonte: Ferreira, 2008).

Ferreira (2009) avaliou também a remoção, via oxidação por ozônio da mistura, de 17β-Estradiol/17α-Etinilestradiol presentes em solução de concentração 10µg/L quando oxidados

separadas e 20µg/L quando oxidados juntos. Os resultados obtidos nos três valores de pH analisados são mostrados nas Figuras 3.16 e 3.17.

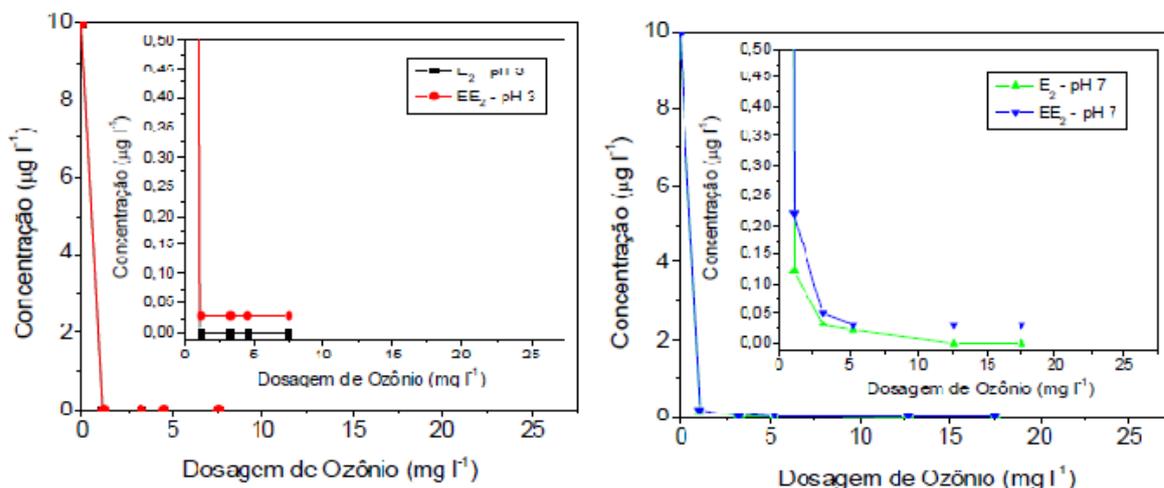


Figura 3.16 - Remoção da mistura 17β-Estradiol/17α-Ethinylestradiol pelo processo de ozonização em pH 3 e pH7. (Fonte: Ferreira, 2008).

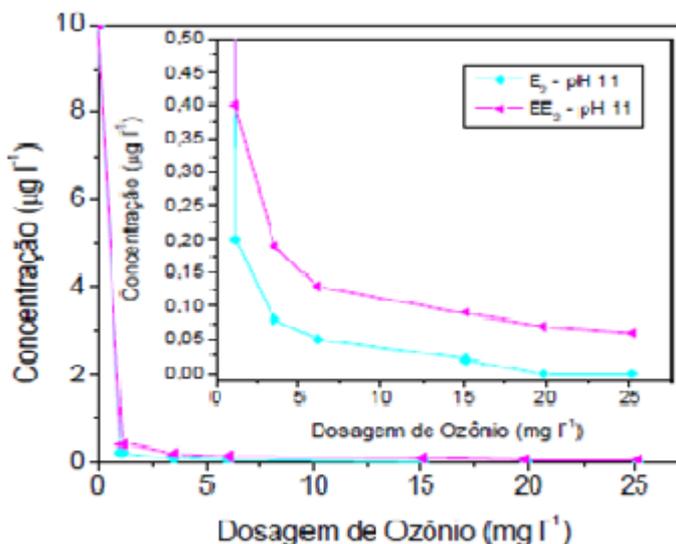


Figura 3.17 - Remoção da mistura 17β-Estradiol/17α-Ethinylestradiol pelo processo de ozonização em pH 7 e pH 11. (Fonte: Ferreira, 2008).

Em mistura, para todas as faixas de pH, o 17β-Estradiol apresentou melhor resultado frente ao processo de ozonização em relação ao 17α-Ethinylestradiol. A remoção deste último em pH 11 foi muito baixa quando comparada às anteriores, na ordem de 98% para 17β-Estradiol e 96% para o 17α-Ethinylestradiol. Já em pH 3 as remoções foram de praticamente 100% para 17β-Estradiol e 99,7% para 17α-Ethinylestradiol (Ferreira, 2008). A eficiência da

remoção destes estrogênios via ozonização está de acordo com os estudos de Huber *et al* (2003) quando estes concluíram que, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol apresentaram alta constante de reação com ozônio

A remoção dos estrogênios aumentou quando foram usadas maiores concentração de ozônio, no entanto, não foi possível remover todos os compostos ditos desreguladores endócrinos presentes na solução. Os resultados obtidos por Ferreira (2008) são condizentes com publicações anteriores como Hurber e al (2003), Alum *et al* (2004), Bila *et al* (2007). Ferreira (2008) analisou o consumo de ozônio durante a ozonização dos estrogênios nos três valores de pH investigado e o consumo de ozônio conforme a concentração inicial dos estrogênios separados ou juntos. Os resultados foram expressos na Figura 3.18

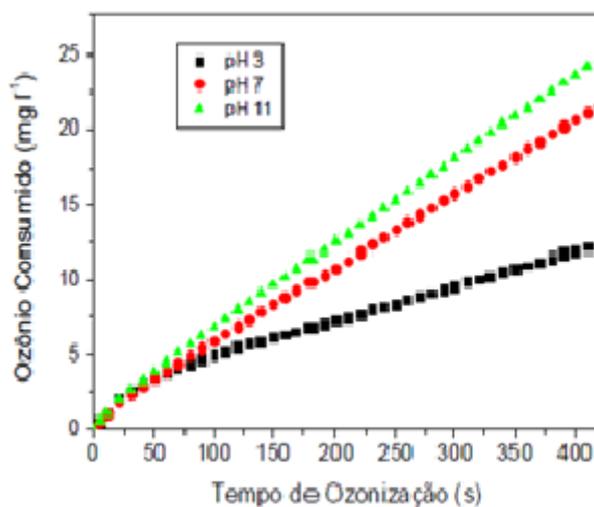
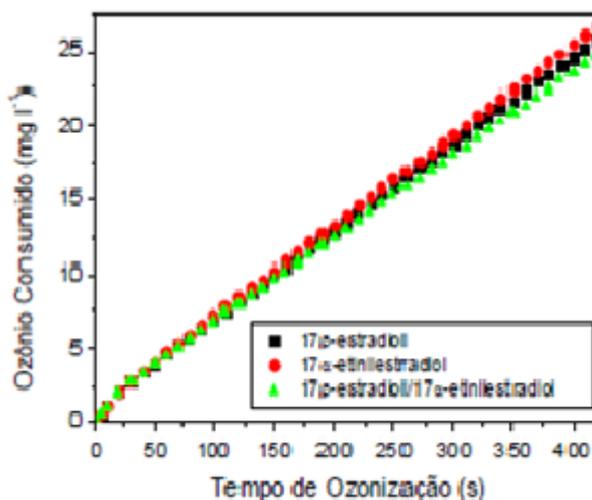


Figura 3.18 - Consumo de O₃ durante a ozonização dos estrogênios nos três valores de pH. (Fonte: Ferreira 2008).

O maior consumo de ozônio em pH neutro ou básico pode estar relacionado ao fato de que, além de parte deste ser consumido durante o processo de oxidação, ocorre a decomposição desta espécie em radicais HO. Ferreira (2008) encontrou os mesmos resultados quando comparou o consumo de O₃ tendo em vista diferentes concentrações iniciais dos estrógenos, isto é, partindo-se de 10 ou 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a quantidade de ozônio consumido foi praticamente a mesma. A pesquisadora justifica o ocorrido a partir das baixíssimas concentrações de micropoluinte presente na solução aquosa. A Figura 3.19 representa os resultados obtidos.

Figura 3.19 – Comparação do consumo de ozônio durante a ozonização dos estrogênios em mistura e separados, nos valores de (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11. Fonte: Ferreira (2008)



5.2 OZONIZAÇÃO NA PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A adição de peróxido de hidrogênio no meio reacional tem por finalidade acelerar a decomposição do ozônio molecular em radicais HO. Para tanto, o peróxido de hidrogênio precisa estar na forma dissociada. Esta dissociação ocorre com maior velocidade em meio com pH alcalino.

Os resultados dos trabalhos realizados por Ferreira (2008) demonstraram que o peróxido de hidrogênio não apresentou alterações significativas na eficiência do processo de ozonização do 17 β -Estradiol, mesmo usando razões molares da ordem de O₃/H₂O₂ de 2:1. Concentração excessiva de H₂O₂ provoca efeito contrário, isto é, funciona como capturador de radicais hidroxila formando uma espécie que tem menor poder oxidativo que o radical capturado (Balcioglu e Otker, 2003, Legrini *et al.*,1993).

5.3 Pré – oxidação com hipoclorito de cloro

Gerolin (2008) realizou trabalho para verificar a ocorrência e remoção de alguns desreguladores endócrinos como, Estrona, 17 α -Estradiol, 17 α -Etinilestradiol, Estriol. Foram realizadas análises a partir de amostras de água bruta coletadas das ETAs de Campinas e Sumaré (SP) antes do ponto de pré-cloração e de água tratada, na saída do tanque de contato, ou seja, após a desinfecção final. O sistema é composto por cinco subestações sendo que as ETAs 3 e 4 são as duas maiores estações de tratamento de água,

responsáveis por grande parte do abastecimento do município de Campinas. Estas estações compartilham um sistema único de pré-tratamento, fazendo-se a pré-cloração e adição de carvão ativado em pó na água bruta, quando necessário. Como coagulantes, são utilizados sulfato férrico ou policloreto de alumínio (PAC), em pH 6,3 e 7,0 respectivamente. Na Tabela 3.10 estão relacionadas às condições de operação das Estações de Tratamento de Campinas e Sumaré bem como as eficiências de remoção dos estrogênios.

As unidades de tratamento, coagulação, floculação, sedimentação e filtração não são capazes de remover micros contaminantes em baixíssimas concentrações. Os resultados obtidos pela autora demonstram que o estrona foi o composto encontrado com menor concentração nas águas analisadas e com maior remoção, sendo 99% para ETA de Campinas e 79% para ETA de Sumaré.

Tabela 3.10 - Condições de operação das ETA Campinas e Sumaré estudadas no período das coletas. (Fonte: Gerolin, 2008)

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

DE	Data da coleta	ETA de Campinas			ETA de Sumaré		
		Água bruta	Água tratada	Remoção	Água bruta	Água tratada	Remoção
E1	14/08/07	2,53±0,5	<LOQ	-	0,37±0,08	0,07±0,007	81%
	27/08/07	11,6 ± 0,3	0,10 ± 0,01	99%	0,54±0,05	0,07±0,007	87%
	03/09/07	0,15±0,02	<LOQ	-	0,33±0,1	0,10±0,007	79%
E2	14/08/07	9,07 ± 0,9	1,05±0,04	88%	7,27±0,9	1,45±0,04	80%
	27/08/07	3,00 ± 0,3	0,78 ± 0,04	74%	5,25 ± 0,4	1,48±0,3	72%
	03/09/07	4,31±0,02	0,95±0,2	77%	6,66 ± 0,3	1,02±0,1	84%
E3	14/08/07	3,93 ± 0,4	1,24 ± 0,04	68%	5,16 ± 2	1,44±0,05	59%
	27/08/07	3,23 ± 1	0,34 ± 0,01	89%	6,10±1	1,80±0,5	79%
	03/09/07	3,00 ± 1	0,53±0,07	82%	1,09 ± 0,09	2,05±0,007	-
EE2	14/08/07	444 ± 16	275±16	38%	786 ± 9	472 ± 9	42%
	27/08/07	nd	nd	-	nd	nd	-
	03/09/07	nd	nd	-	nd	nd	-

Em seguida, o 17β-Estradiol, apresentou eficiência de 79% nas duas estações. Já o 17α-Etinilestradiol teve remoção de cerca de 40%. Diante dos estudos analisados, percebe-se que a cloração consegue reduzir bastante a concentração de substâncias com função de desregulação endócrina, no entanto, os subprodutos formados após o processo de cloração representam riscos, uma vez que baixas concentrações de estrógenos podem apresentar elevada atividade estrogênica (Gerolin, 2008).

O processo oxidativo atua sobre o anel fenólico da cadeia reduzindo a concentração do estrogênio, porém, não reduz sua estrogenicidade (Choi *et al*, 2006). Devido ao fato de a

água distribuída às populações das cidades de Campinas e Sumaré apresentarem concentrações traços destes compostos, bem como a ocorrência de formação de subprodutos durante o processo de remoção dos contaminantes, conclui-se que a água representa acentuado risco à população que faz uso desta. Salienta-se que somente 10% dos compostos com atividade estrogênica são facilmente oxidados pelo cloro, enquanto que a adição de 5 mg/L de carvão ativado em pó com 4 horas de contato remove entre 50 e 98% destes compostos. (Gerolin, 2008).

5.3.1 Pré- oxidação com hipoclorito de sódio simulando uma ETA convencional

Bianchetti (2008) realizou estudos, uma simulação da etapa de pré-oxidação, em escala de bancada para avaliar a eficiência da remoção do 17 α -Ethinilestradiol, possível contaminante da água destinada ao abastecimento humano, usando hipoclorito de sódio como pré-oxidante. Considerou-se uma estação convencional como referência para os estudos.

A água utilizada na análise foi preparada, em laboratório, a partir de água destilada, concentração conhecida de 17 α -Ethinilestradiol, caulim e bicarbonato de sódio. Isto foi feito devido à variação das características da água bruta de algum manancial, fato que poderia dificultar a reprodutibilidade das análises e o conseqüente erro na interpretação dos dados.

A solução de 17 α -Ethinilestradiol a 1,0 μ g.L⁻¹ foi preparada, inicialmente, a partir da dissolução de pílulas do anticoncepcional *Neovlar*. No entanto, discrepâncias entre a concentração esperada e a encontrada desta substância na solução sinalizavam para a baixa afinidade entre o 17 α -Ethinilestradiol e as partículas suspensas de caulim. Com isso, o medicamento foi substituído por cápsulas contendo a substância pura.

Á água, foi conferida turbidez de 10 ou 100 uT, utilizando-se caulim e aparelho de *jar test* para simular a etapa de pré-oxidação, admitindo, após o teste, que a alcalinidade deveria estar situada em torno de 35,0 mg.L⁻¹ de CaCO₃. A Tabela 3.11 traz o resumo dos parâmetros das águas analisadas.

Tabela 3.11 - Parâmetros das águas analisadas

PARÂMETRO	ÁGUA TIPO I	ÁGUA TIPO II
Turbidez (uT)	10,0 ± 0,5	100 ± 5
Cor aparente (uH)	39,0 ± 4,0	380 ± 30
Alcalinidade total (mg.L ⁻¹ de CaCO ₃)	35,0 ± 5,0	35,0 ± 5,0
Temperatura (°C)	24,0 ± 1,0	24,0 ± 1,0
pH	7,5 ± 0,4	7,5 ± 0,4

Fonte: Bianchetti, 2008.

Água do Tipo I ou II foi submetida ao equipamento de *jar teste* durante 30s a um gradiente de velocidade de 800s⁻¹, para homogeneizar o hipoclorito na solução. A concentração de cloro usado foi de 3 mg.L⁻¹. Na Figura 3.20 estão expressas as condições do ensaio de bancada realizado por Bianchetti (2008).

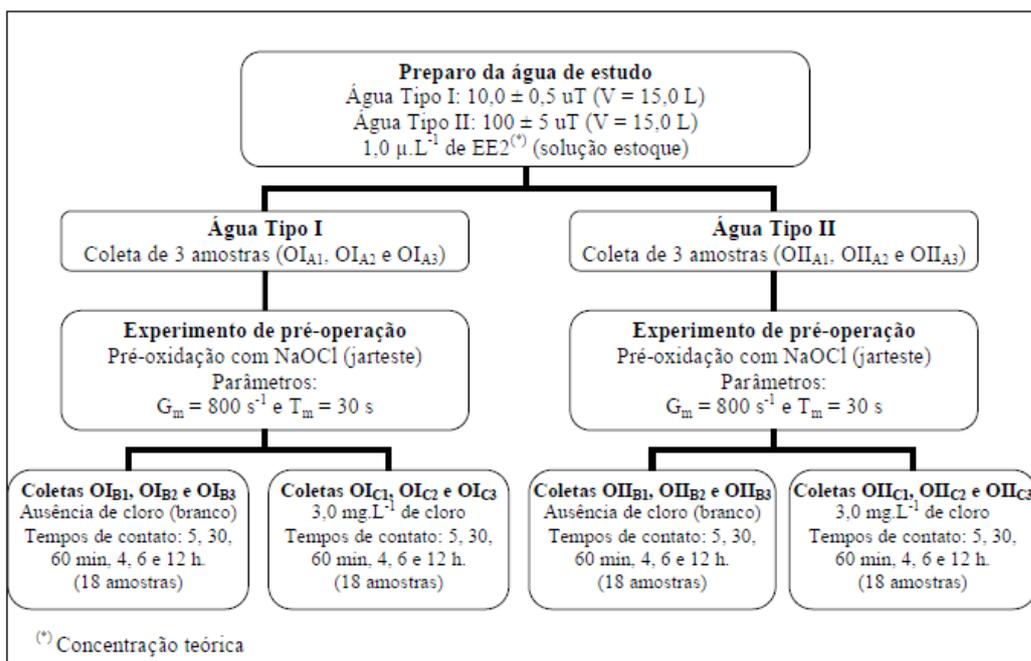


Figura 3.20 - Características das águas analisadas. (Fonte: Bianchetti, 2008).

Os pontos de dosagem ótima para cada um dos coagulantes (cloreto férrico e sulfato de alumínio) foram determinados a partir da confecção dos diagramas de coagulação. A escolha destes pontos se deu com base nos menores valores de turbidez remanescente, similarmente ao que ocorre em estações de tratamento de água.

Após estas etapas, amostras foram submetidas à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para detecção e quantificação do etinilestradiol, em fase de teste.

A Tabela 3.12 ilustra as variações das concentrações do estrógeno antes e após o processo de pré-oxidação em virtude da forma de preparo da amostra, bem como concentrações de etinilestradiol teóricas e quantificadas nas amostras coletadas antes da realização do experimento-teste –Água Tipo II.

Tabela 3.12 - Parâmetros das águas analisadas

CONCENTRAÇÃO	ABSOLUTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RELATIVA (%)
Teórica	7,143	-
T _{A1}	4,808	67,3
T _{A2}	4,928	69,0

Fonte: Bianchetti, 2008.

Necessidades de refino dos processos durante o preparo da solução e das etapas de pré-cromatografia foram apontadas como possíveis causas da concentração inferior de estrógeno encontrada na amostra. No entanto, alíquotas desta amostra foram submetidas ao processo de pré-oxidação com hipoclorito de sódio.

A concentração remanescente de estrógeno foi avaliada a partir de análise cromatográfica. Algumas análises de alíquotas que não receberam dosagem do oxidante mostraram ter as concentrações de 17 α -Etinilestradiol aumentadas, porém, análises de amostras que foram submetidas à oxidação demonstraram significativa redução do estrógeno. Os resultados e eficiências do processo podem ser analisados pelas Tabelas 3.13 e 3.14.

Tabela 3.13 - Concentrações remanescentes de etinilestradiol ($\mu\text{g.L}^{-1}$) após experimento-teste de pré-oxidação com hipoclorito de sódio – Água Tipo II

Amostra	T _{B1}	T _{B2}	T _{C1}	T _{C2}	T _{D1}	T _{D2}
Cloro (mg.L^{-1})	0,0	0,0	1,0	1,0	3,0	3,0
Coletas	EE2 remanescente ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					
1 (5 min.)	4,751	4,029	3,441	2,313	0,203	0,218
2 (30 min.)	4,365	<u>5,941</u>	0,454	0,432	0,152	0,167
3 (60 min.)	4,028	3,785	0,134	0,164	0,768	< LD
4 (6 h)	<u>5,253</u>	<u>5,163</u>	0,195	0,228	0,943	0,450
5 (12 h)	4,806	4,900	0,209	0,279	2,543	0,169
6 (24 h)	4,607	4,668	0,396	0,604	0,694	1,382

< LD – Abaixo do limite de detecção ($0,050 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Fonte: Bianchetti, 2008.

Tabela 3.14 - Eficiência média de remoção de etinilestradiol, em função do tempo de contato-experimento teste.

Tempo de contato (min.)	5	30	60	360	720	1.440
Eficiência média (%)						
Amostras T _{B1} e T _{B2}	9,9	10,4	19,8	-	3,4	4,8
Amostras T _{C1} e T _{C2}	40,9	90,9	96,9	95,7	95,0	89,7
Amostras T _{D1} e T _{D2}	95,7	96,7	99,2	94,4	96,5	78,7

Alterações nas metodologias de análises foram feitas a fim de se obter resultados mais precisos. Optou-se por adotar coletas em triplicatas, ao invés de duplicatas. A solução de 17 α -Etinilestradiol foi preparada a partir do produto puro e com redução do período de experimento, visto que a redução mais significativa do estrógeno ocorria na primeira hora. A concentração esperada, oriunda da utilização da solução estoque, era de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no entanto a encontrada foi conforme Tabela 3.15.

Tabela 3.15 - Concentração de etinilestradiol quantificadas nas amostras coletadas da realização dos ensaios de pré-oxidação – Água tipo I e II (Fonte: Bianchetti, 2008).

EXPERIMENTO	ÁGUA	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
1	Tipo I	OI _{A1}	0,599
		OI _{A2}	0,637
		OI _{A3}	0,577
2	Tipo II	OII _{A1}	0,655
		OII _{A2}	0,786
		OII _{A3}	0,861

Vale ressaltar que, as medidas apontadas não foram suficientes para sanar o problema da solução de etinilestradiol. Prova disso é o fato da solução apresentar uma concentração diferente da esperada. Bianchetti (2008) cita a necessidade de refinamento dos processos de preparação da água de estudo e concentração da amostra.

Os resultados obtidos pelo processo de pré-oxidação com hipoclorito de sódio são mostrados na Figura 3.26. Percebe-se, claramente que, independentemente da turbidez da água, ocorre a redução da concentração de 17 α -Etinilestradiol pelo emprego da pré-cloração. Mesmo assim é possível observar que, grande parte das amostras tiveram sua concentração, 90% em média, reduzida usando 1,0 mg.L⁻¹ de cloro em trinta minutos de contato, valor inferior ao limite de detecção do equipamento de cromatografia (L.D. = 0,050 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

A Figura 3.21 ilustra os resultados obtidos após a realização do processo, bem com as eficiências em relação ao tempo de contato para Águas do Tipo I e II.

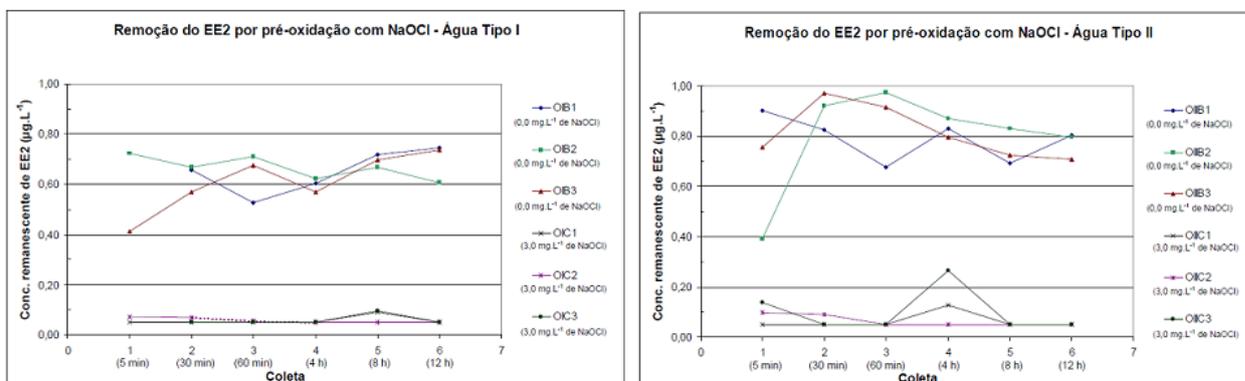


Figura 3.21 – Concentração remanescente de EE2 ao longo do ensaio de pré-oxidação com hipoclorito de sódio – Água Tipo I e II. (Fonte: Bianchetti, 2008).

Os resultados apresentam algumas discrepâncias que podem ser como já mencionado, devido à necessidade de melhorias no preparo da amostra, como por exemplo, aumento da concentração do estrógeno, após a pré-cloração.

Tabela 3.16 - Eficiência média de remoção de 17 α -Ethinilestradiol por pré-oxidação, em função do tempo de contato – Águas do Tipo I e II

Tempo de contato (min.)		5	30	60	240	480	720
		Eficiência média (%)					
Água Tipo I	Amostras OI _B	6,1	-4,4	-5,6	0,9	-14,9	-15,1
	Amostras OI _C	89,8	90,7	91,7	91,7	86,9	91,7
Água Tipo II	Amostras OII _B	10,9	-18,0	-11,5	-8,4	2,5	-0,2
	Amostras OII _C	84,7	93,5	93,5	80,8	93,5	93,5

Fonte: Bianchetti, 2008.

Bianchetti (2008), através de experimentos, determinou que 22,5 mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio em pH de 7,6 e 22,0 mg.L⁻¹ de cloreto férrico em pH compreendido entre 7,0 8,25 constituem pontos de dosagem ótima de coagulante para as características da água analisada. Concluiu também que houve diminuição da eficiência de remoção de cor e turbidez com aumento de acidez ou da alcalinidade. Para o cloreto de ferro, foi adotada concentração de 22,0 mg.L⁻¹ e pH de 7,4. No entanto, os resultados finais das análises demonstraram que, ao contrário do ocorrido com a pré-oxidação, os processos de coagulação e decantação, quando precedidos de sulfato de alumínio ou cloreto férrico como coagulantes, não mostraram nenhum indicio de remoção de 17 α -Ethinilestradiol da água

tratada Tipo I e II. Através da Figura 3.22 é possível comparar o comportamento das amostras brancas e coaguladas.

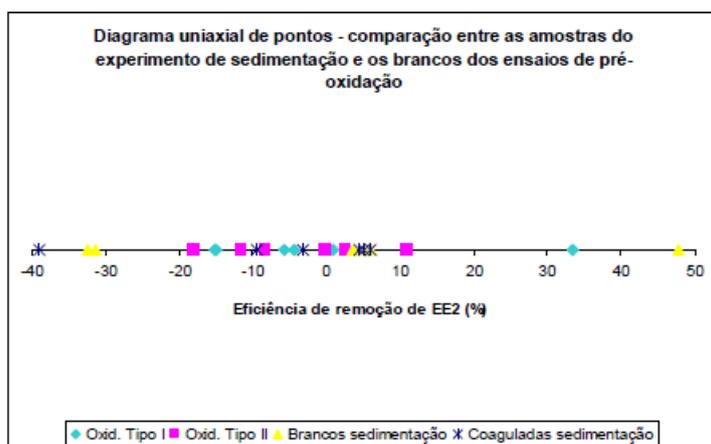


Figura 3.22 - Diagrama uniaxial de pontos para comparação das eficiências de remoção entre as amostras do experimento de sedimentação e os brancos dos ensaios de pré-oxidação – Águas Tipo I e II. (Fonte: Bianchetti, 2008).

Este baixo desempenho pode estar relacionado à diferença de polaridade entre o estrógeno e o caulim, composto usado para sintetizar a turbidez da água bruta. Neste caso, há muito pouca afinidade entre as duas substâncias o que prejudica o processo de adsorção do 17 α -Ethinilestradiol pelo caulim. Enquanto as partículas suspensas sedimentam-se o estrógeno permanece na solução.

5.4 – Remoção de estrogênios e estrogenicidade

O potencial estrogênico de alguns desreguladores endócrinos está relacionado a grupos ligantes à estrutura base destes compostos. No caso do 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol a estrogenicidade está relacionada à hidroxila ligada ao anel aromático. Dependendo da posição (*orto*, *meta*, *para*) que a hidroxila estiver ligada no anel aromático, a estrogenicidade pode ser maior, resultando numa ligação mais efetiva do estrogênio ao receptor de estrogênio e elucidando a resposta estrogênica.

Conforme relatado por Bila (2005), células de leveduras são transformadas pela introdução de vetores contendo sequencias de DNA para receptores humanos ou de animais, junto

com o gene repórter contendo elementos que dão respostas ao Ensaio. A ativação do receptor pela substância testada resulta na estimulação da expressão do gene repórter, seguida pela ativação de um elemento resposta. Estes ensaios são bastante usados para avaliar substâncias químicas suspeitas de causar atividade estrogênica através da interação com receptores de estrogênio. Os ensaios que utilizam a levedura contendo REh para identificar substâncias estrogênicas pela interação com o receptor de estrogênio humano, é comumente referido como ensaio YES (*yeast estrogen-inducible expression system* ou *recombinant yeast estrogenic system*) ou RYA (*recombinant yeast assay*).

O ensaio YES é prático e altamente sensível, ele permite detectar concentrações de 17 β -Estradiol da ordem de 2 ng/L. A medida é determinada pela produção da enzima galactosidase que metaboliza o substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D galactopiranosida (CPRG) presente no meio, que é um produto amarelo e muda para vermelho, e pode ser medido por absorvância a 540 nm. Esta medida de absorvância pela espectrofotometria permite estimar a quantidade de substância estrogênica no meio de análise.

Sinergismo, antagonismo e aditivo são efeitos que podem ser identificados na atividade estrogênica decorrentes de combinação de estrogênios. Quando os efeitos do estrogênio superam o esperado, recebe o nome de sinergismo e quando não atingem o esperado é chamado de antagonismo. Por alcançar os efeitos esperados é definido de aditivo.

BILA (2005) realizou estudos para avaliar a atividade estrogênica das amostras aquosas de 17 α -Estradiol ozonizados. Usando ensaio YES ele identificou atividade estrogênica em extratos de amostras ozonizadas em pH 3, que é levemente diminuída com o aumento da dosagem de ozônio consumido. Os extratos ozonizados em pH 7 e pH 11 apresentaram elevada estrogenicidade. Em pH 7, o aumento da dosagem de ozônio provocou uma queda da estrogenicidade, o que não ocorreu em pH 11. Neste último, houve redução da concentração de 17 α -Estradiol, porém, a estrogenicidade aumentou. Este fato pode estar relacionado com a natureza da espécie oxidante presente em meio com pH elevado, no caso, o HO, que não é seletivo, podendo assim, atacar diversas partes da cadeia do estrogênio levando à formação de diversos subprodutos que têm estrogenicidade similar à do 17 α -Estradiol. Nestes valores de pH uma vez que este foi quase, na sua totalidade, removido no início da ozonização.

Os trabalhos de Bila (2005) demonstraram, conforme Figura 3.23, que, em pH 3 houve maior remoção da estrogenicidade da amostra, porém, a oxidação do 17 α -Estradiol foi mais

lenta. No pH 11, a remoção de 17 α -Estradiol foi superior a 99,89%, no entanto, as amostras ozonizadas apresentaram maior estrogenicidade. Contudo, sugere-se que, em meio ácido, há remoção de estrogenicidade do 17 α -Estradiol usando ozônio enquanto que, em meio neutro ou básico não. A presença de resíduos do estrógeno e subprodutos da ozonização em concentrações da ordem de nanograma por litro faz com que a amostra aquosa ainda continue sendo estrogênica.

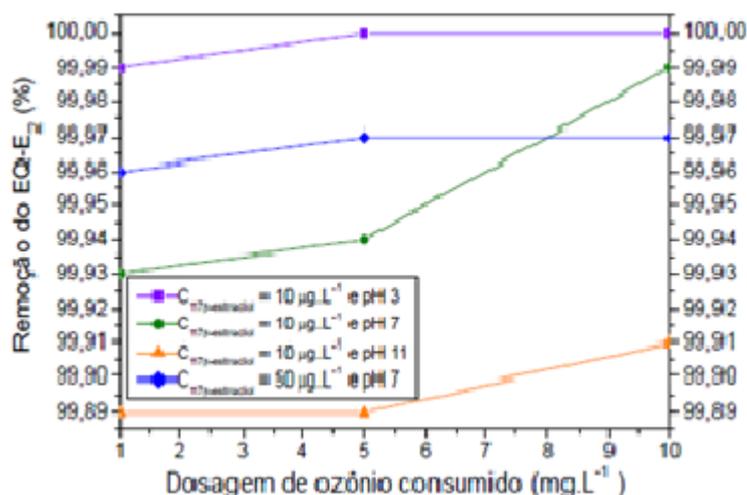
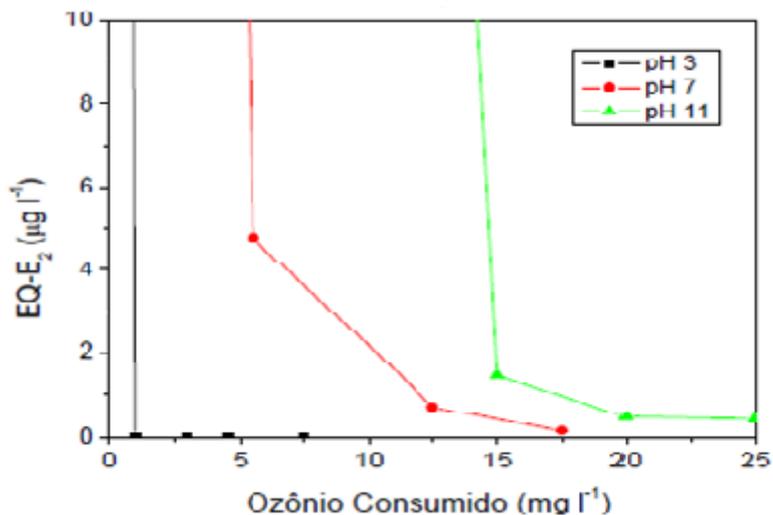


Figura 3.23 - Remoção do EQ-E2 dos extratos das amostras ozonizadas.
 Fonte: Bila, 2005.

Resultados das análises de amostras de misturas de 17 β - estradiol / 17 α – etinilestradiol ozonizadas são mostrados na Figura 3.24 onde se verifica que, em pH 3, os extratos das amostras ozonizadas apresentaram valores de EQ-E2 iguais a zero, mesmo com a menor dosagem de ozônio utilizada, evidenciando que a atividade estrogênica foi completamente removida, enquanto que em pH 7 e 11, os dados demonstram que houve diminuição dos valores EQ-E2 mas não sua remoção total, indicando presença de atividade estrogênica. O aumento do consumo de O₃ em pH 7 e 11 deve-se ao fato da decomposição deste composto em radicais hidroxilas.

A ozonização de 17 β - estradiol/17 α – etinilestradiol e 17 α – etinilestradiol quando realizada em pH 3, na presença de peróxido de oxigênio, não demonstrou alteração na atividade estrogênica.

Figura 3.24 – EQ-E₂ dos extratos das amostras ozonizadas de 17 β - estradiol/17 α – etinilestradiol nos três valores de pH avaliados. Fonte: Ferreira, 2008.



Em pH 11 não foi avaliada a remoção da atividade estrogênica pelo processo de ozonização devida à decomposição de todo O₃ em radical hidroxila (HO). Em pH 11 a estrogenicidade aumentou, provavelmente porque os compostos formados possuem maior estrogenicidade ou porque os subprodutos são formados em maior concentração. Ferreira (2008) concluiu ainda que, a adição de peróxido de hidrogênio não proporcionou nenhuma melhoria da remoção de estrógeno via ozonização. Estes mesmos resultados foram encontrados quando cada composto foi analisado individualmente.

6 Considerações Finais

A diminuição da concentração de estrógenos na água de abastecimento humano não significa, necessariamente, que o processo empregado seja eficiente. Pesquisas abordadas nesta revisão bibliográfica, comparando a eficiência da ozonização em relação ao pH, têm demonstrado que remoção superior a 99,8% de 17 α -Etinilestradiol apresentou maior estrogenicidade. A ozonização é mais eficaz à medida que aumenta a basicidade do meio, no entanto, devido à baixa seletividade da espécie oxidante, no caso o radical OH, inúmeros subprodutos são formados nesta etapa. O problema é que, estes últimos, podem ser muito perigosos para a saúde, representando, muitas vezes, maior potencial maléfico do que o próprio estrógeno que o originou. Os estudos demonstraram que o aumento da

concentração do estrógeno não resultou em alterações significativas no comportamento oxidativo do etinilestradiol frente às mudanças de pH do meio reacional.

Ficou clara a necessidade de refinamento dos processos de preparação da solução de estudo e concentração da amostra. Coletar água in natura não foi possível devido à presença de outros compostos orgânicos que poderiam consumir ozônio molecular ou radical OH. Além do mais, as concentrações de estrógenos em matrizes ambientais estão abaixo da capacidade de detecção dos aparelhos utilizados. Vale salientar que a preparação da solução em laboratório não produziu resultados muito satisfatórios, seja pela baixa solubilidade de 17 α -Etinilestradiol ou pela baixa interação deste com o demais substâncias, usadas para ajustar os parâmetros da água. Estudos feitos por Gerolin (2008) em ETAs demonstraram que os processos convencionais – coagulação, floculação, sedimentação, filtração - aplicados ao tratamento de água não apresentaram resultados animadores quanto à remoção de substâncias com características de desregulação endócrina.

Estudos revelaram presença de estrógenos em concentrações remanescentes abaixo do limite de detecção, isto é, inferior a 0,03 ng.L⁻¹. Este resultado revela que os processos empregados removeram de 70 a 99% desses micropoluentes, todavia, esta concentração traço, associada aos subprodutos da cloração expõe usuários destas águas aos efeitos dos disruptores endócrinos.

A remoção de micropoluentes nesta concentração em águas de abastecimento representa um grande desafio, pois diminui vertiginosamente a possibilidade de choque entre o estrógeno e a espécie oxidante contribuindo para sua persistência na água tratada para ser utilizada no abastecimento doméstico.

7 REFERÊNCIAS E BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. AHMED, S. A. “The Immune System as a Potencial Target for Environmental Estrogens (Endocrine Disrupters): a New Emerging Field”, *Toxicology*, v. 150, pp. 191-206, 2000.
2. ALMEIDA, F.V. Bases Técnico-Científicas para o Desenvolvimento de Critérios de Qualidade de Sedimentos referentes aos Compostos Orgânicos Persistentes. 2003. 114p. Tese de Doutorado. Instituto de Química, UNICAMP, Campinas-SP.
3. ALTENBURGER, R., A. KORTENKAMP, A. “Synergisms with Mixtures of Xenoestrogens: A Reevaluation Using the Method of Isoboles”, *The Science of the Total Environment*, v. 221, pp. 59-73, 1998.
4. ALUM, A., YO ON, Y., WESTERHOPFF, P., ABBASZADEGAN, M., 2004 “Oxidation of Bisphenol A, 17 β Estradiol, and 17 α -Ethinyl Estradiol and Byproduct Estrogenicity” *Environmental Toxicology*, v. 19, pp. 257-264.
5. AMABIS, J. M. e MARTHO, G.R. Fundamentos da Biologia Moderna. 4ed. Vol. único. Rio de Janeiro. Moderna, 2007. 856p.
6. AQUINO, S. F; MIERZWA, J. C; VERAS, L. R.V. Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano/Valter Lucio de Pádua (coordenador). Rio de Janeiro: ABES, 2009
7. ARAUJO, J. C. Estudo da Eficiência do Tratamento de Efluentes da Cidade de Araraquara-SP na Remoção de Hormônios Sexuais. 2006. 83p. Dissertação (mestrado) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
8. BAIRD, C. Química ambiental. 2.ed. Porto Alegre-RS: Bookman, 2002. 622p.
9. BALCIOGLU, I. A., ÖTKER, M. (2003) “Treatment of Pharmaceutical Wastewater Containing Antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ Processes” *Chemosphere*, v.50 (1), pp. 85-95.
10. Bara, R.: Colombo, J. C.; Eguren, G.; Gamboa, N.; Jardim, W.F.; Mendoza, G. (2005). *Persistent Organic Pollutants (POPs) in Eastern and Western South American Countries*. *Environ. Contam. Toxicol.*; 185, 1-33.

11. BIANCHETTI, F. J. Remoção do agente hormonalmente ativo etinilestradiol por pré-oxidação e coagulação: estudo em escala de bancada. 2008. 82 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
12. BILA, D. M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v.30, p.651-666, 2007.
13. BILA, D. M., Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. UFRJ/COPPE, 2005. 281p.
14. BODZEK, M., DUDZIAK, M. "Elimination of Steroidal Sex Hormones by Conventional Water Treatment and Membrane Processes", *Desalination*, v. 198, pp. 24-32, 2006.
15. CAS, 2010. Acessado em 10 de fevereiro de 2012. Disponível em <www.cas.org>.
16. CEC - Commission of the European Communities. Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, COM (1999) 706 final, 1999.
17. Chen, Z.; Pavelic, P.; Dillon, P.; Naidu, R. (2002). *Determination of Caffeine as a Tracer of Sewage Effluent in Natural Waters by On-line Soli-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*. *Water Res.* 36, 4830-4838.
18. CHOI, K. J., KIM, S. G., KIM, C. W., PARK, J.K. Removal efficiencies of endocrine disrupting chemicals by coagulation/flocculation, ozonation, powdered/granular activated carbon, and chlorination . *Korean J. Chem. Eng.*, v. 23, n.3, p.399-408, 2006.
19. CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 mar. 2005.
20. CORDEIRO, D. Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009. 89p. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-11032010-102102/>>. Acesso em: 15/01/2012.

21. FERREIRA, M. G. M.. Remoção da Atividade Estrogênica de 17β -Estradiol e de 17α -Ethinilestradiol pelos Processos de Ozonização e O_3/H_2O_2 . Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química, 2008. 173p.
22. GEROLIN, E. R. R. Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – São Paulo. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2008. 187p.
23. GHISELLI, G., JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, v. 30, n. 3, 2007.
24. GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação de interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Tese de doutorado. UNICAMP. Instituto de Química. 27 setembro 2006. 181p.
25. GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P.M. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. *Arq. Bras. Endocrinologia Metab.*, v.44, p.323-329,2000.
26. GREIM, H.Z. (2004). *The Endocrine and Reproductive System; Adverse Effects of Hormonally Actives Substances*. *Pediatrics* 114(4), 1070-1075.
27. GUUILLETTE, L. J. J., PICKFORD, D. B., CRAIN, D. A., *et al.*, 1996 “Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment” *General and Comparative Endocrinology*, v. 101, pp. 32-42.
28. HUBER, M., CANONICA, S., PARK, G. -Y., GUNTEN, U., V., 2003 “Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes” *Environmental Science Technology*, v. 37(5), pp. 1016-1024.
29. IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Saneamento Básico e Contaminantes Orgânicos. v. 25, n. 2. Rio de Janeiro: 2006.
30. JOBLING, S. NOLAN, M., TYLER, C. R. E SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*, v. 32, n. 17, p. 2498 – 2506, 1998.

31. JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *The Science of Total Environment*, v. 87, p. 163-173, 2000.
32. KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L., BUXTON, H.T. “*Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance*”, *Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 6, pp.1202-1211, 2002.
33. LAUDICÉIA, G. L.; MARCHI, R. R.; MARCHI, J. B. G. S.; MOURA, J. A. LORENZON, C. S.; CRUZ, L. A.; AMARAL, L. A. Estrogênio em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. *Quím. Nova*, v. 33, n.3, 639-643, 2010.
34. LEGRINI, O., OLIVEROS, E., BRAUN, M. “Photochemical Processes for Water Treatment”, *Chemical Reviews*, v. 93, p. 671-698, 1993.
35. LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A. KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. (2003). *Endocrine Disruptors in the Environment – IUPAC Technical Report*. *Pure Appl. Chem.* 75 (5), 632-681.
36. LIU, B., LIU, X., 2004 “Direct Photolysis of Estrogens in Aqueous Solutions” *Science of the Total Environment*, v. 320, pp. 269-274.
37. MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J.C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos a ação de disruptores endócrinos? *Cadernos de Saúde pública*, Rio de Janeiro, v. 15, p. 845-850, 1999.
38. MOREIRA, D.S. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte. 2008. 123p Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.
39. NASH, J. P., KIME, D. E., VAN DER VEN, L. T. M., WESTER, P. W., BRION, F., MAACK, G., STAHLSCHMIDT-ALLNER, P., TYLER, C. R. “Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish”, *Environmental Health Perspectives*, v. 112, n. 17, 2004.
40. OTOMO, J.I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação

de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2010.170p.

41. RICHARDSON, S.D. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.*, v. 81, n. 12, p. 4645-4677, 2009.
42. Souza, Francisco Gláucio Cavalcante de. Remoção de Desreguladores Endócrinos por Fotocatálise Heterogênea e Ozonização. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009. 89p.
43. SOUZA, Renata Rodrigues de Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, 2011. 174p.
44. USEPA – *United States Environmental Protection Agency. Research Plan for Endocrine Disruptores, Washington, 1998.*
45. YING, G.-G.; KOOKANA, R. S; RU, Y.-J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, v. 28, 545-551, 2002.

7.1 Bibliografia citada em *apud*

1. BERKOW, R.; BEERS, M. H.; et al. Manual Merck de Informação Médica: Saúde Para a Família. [S.ed.], [S.l] *apud* BIANCHETTI, F.J. Remoção do agente hormonalmente ativo etinilestradiol por pré-oxidação e coagulação: estudo em escala de bancada. 2008. 82 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
2. BIRKETT, J.W., LESTE, J. N., 2003. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process, 1º edição, Lewis Publishers *apud* OTOMO, J.I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2010. 170p.
3. BIRKETT, J.W., LESTE, J. N., 2003. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process, 1º edição, Lewis Publishers *apud* FERREIRA, MILENA

- GUEDES MANIERO. Remoção da Atividade Estrogênica de 17β -Estradiol e de 17α -Ethinilestradiol pelos Processos de Ozonização e O_3/H_2O_2 . Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química, 2008. 173p.
4. BROOKS, A. N. Comparative physiology of the reproductive endocrine system in laboratory rodents and humans. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1633 – 1646, 1998 *apud* GEROLIN, E. R. R. Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – São Paulo. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2008. 187p.
 5. CARLSEN, E., GIWERCMAN, A., KEIDING, N., *et al.*, 1992 “Evidende for Decreasing Quality of Semen During Past 50 Years” *British Medical Journal*, v. 305, pp. 609-613 *apud* BILA. D. M., Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. UFRJ/COPPE, 2005. 281p.
 6. COLBORN, T.; DURMANOSKI, D.; MYERES, J. P. O futuro Roubado. Porto Alegre: L & PM. 2002 *apud* SOUZA, R.R. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividade antrópicas nas águas da região do Rio Paraíba do Sul, SP, 2011. 174p. Dissertação (mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo.
 7. HARRISON, P. T. C., HOLMES, P., HUMFREY, C. D. N., 1997 “Reproductive Health in Humans and Wildlife: Are Adverse Trends Associated With Environmental Chemical Exposure ?” *The Science Total Environment*, v. 205, pp. 97-106 *apud* BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v..30, p.651-666, 2007.
 8. HARRISSON, J. F., 2000 “Ozone for Point-of Use, Point-of-Entry, and Small Water System Water Treatment Applications – A Reference Manual, Water Quality Association, 86pp *apud* BILA. D. M., Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. UFRJ/COPPE, 2005. 281p.
 9. HUBER, M., TERNES, T. A., VON GUNTEN, U., 2004 “Removal of Estrogenic Activity and Formation of Oxidation Products During Ozonation of 17α -Ethinylestradiol” *Environmental Science Technology*, v. 38(19), pp. 5177-5186 *apud* BILA. D. M., Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. UFRJ/COPPE, 2005. 281p.

10. IRWIN, L. K., GRAY, S., OBERDÖRSTER, E., 2001 “Vitellogenin Induction in Painted Turtle, *Chrysemys Picta*, as a Biomarker of Exposure to Environmental Levels of Estradiol” *Aquatic Toxicology*, v. 55, pp. 49-60. [Janeiro] 2008 XIX, 173 p. 29,7 cm *apud* BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v.30, p.651-666, 2007.
11. JORGENSEN, S. E., LUTZHOFT, H. C., HALLING-SORENSEN, B., 1998 “Development of a Model For Environmental Risk Assessment of Growth Promoters” *Ecological Modelling*, v. 107, pp. 63-72 *apud* BILA, D. M., Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. UFRJ/COPPE, 2005. 281p.
12. Milnes, M. R.; Woodward, A. R.; Rooney, A. A.; Rooney, A. A.; Guillette, L. J.; *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2002, 131, 923 *apud* BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v..30, p.651-666, 2007.
13. NIESSEN, W.M.A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, New York, 2ed Marcel Dekker Inc.1999 *apud* SOUZA, R.R. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do Rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2011. 174p.
14. Nogueira, R. F. P.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* 1998, 21, 69 *apud* BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v..30, p.651-666, 2007.
15. TANAKA, H., YAKOU, Y., TAKAHASHI, A., HIGASHITANI, T., KOMORI, K. “Comparison between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast Assay and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment”, *Water Science and Technology*, v. 43, n. 2, pp. 125–132, 2001 *apud* FERREIRA, MILENA GUEDES MANIERO. Remoção da Atividade Estrogênica de 17 β -Estradiol e de 17 α -Ethinilestradiol pelos Processos de Ozonização e O₃/H₂O₂ [Rio de Janeiro] 2008 XIX, 173 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química, 2008). Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.
16. TERNES, T. A., HIRSCH, R., 2000 “Occurrence and Behavior of X-ray Contrast Media in Sewage Facilities and the Aquatic Environment” *Environmental Science Technology*, v. 34 (13), pp. 2741-2748 *apud* BILA, D. M., Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. UFRJ/COPPE, 2005.

17. TERNES, T. A., MEISENHEIMER, M., MCDOWELL, D., *et al.*, 2002 “Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment” *Environmental Science Technology.*, v. 36 (17), pp. 3855-3863 *apud* BILA. D. M., Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. UFRJ/COPPE, 2005.