



Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente

Occurrence and detections of endocrine disrupters in sewage treatment plant: Environmental complications

Recebido em 07/11/2011

Aceito em 15/03/2012

Aldo Pacheco Ferreira*

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

A preocupação sobre a exposição aos desreguladores endócrinos (DEs) e seus possíveis impactos sobre a fauna e os seres humanos, gradativamente, tem acrescida sua importância. Águas residuais sistematicamente recebem a maioria destes desreguladores e, assim, maior compreensão sobre o destino de DEs no ambiente é extremamente necessária. O objetivo da pesquisa foi analisar a concentração de DEs no afluente e no efluente das estações de tratamento de esgoto (ETEs) da Penha e Ilha do Governador-RJ, ambas compostas por sistemas do tipo lodos ativados convencional (fluxo contínuo) de aeração prolongada. Foi utilizado, como parâmetro de avaliação, a concentração dos seguintes compostos: alquilfenóis, 17 β -estradiol, bisfenol A, complementando com a determinação dos parâmetros físico-químicos: temperatura, ph, oxigênio dissolvido, sólidos suspensos totais, sólidos suspensos voláteis e demanda química de oxigênio total. Foram coletadas amostras simples ao longo da linha de tratamento de cada ETE estudada e após pré-tratamento e extração dos compostos, estes foram analisados por meio das técnicas LC-MS/MS e Elisa. Em algumas amostras, observaram-se concentrações de compostos químicos aqui pesquisados com potencial para desregular o sistema endócrino de organismos vivos, o que redundava principalmente em complicações ao meio ambiente, fauna e a saúde pública.

Palavras-chave: Sistema endócrino, Águas residuárias, Poluição ambiental

ABSTRACT

Concern over exposure to endocrine disruptors (EDs) and their potential impacts on wildlife and humans gradually has improved its importance. Wastewater systematically receive the majority of these endocrine and thus a deeper understanding of the fate of EDs in the environment is extremely necessary. The research objective was to analyzed EDs concentration in the affluent and effluent from the Sludge Wastewater Treatment Plants (SWTPs) Penha and Ilha do Governador, both of type conventional continuous-flow activated sludge with extended aeration. It was used as evaluation parameter the determination of some target compounds, such as: alkylphenols, 17 β -estradiol, bisphenol A, complementing with measures of physical and chemical parameters: temperature, pH, dissolved oxygen, total suspended solids, volatile suspended solids and total chemical oxygen demand. Single samples were collected along the line of treatment of each SWTP, and after pre-treatment and extraction of the compounds, they were analyzed by LC-MS/MS and ELISA techniques. In some samples, we verified concentrations of chemical compounds herein studied that have the potential to disrupt the endocrine system of living organisms, which leads to complications especially in the environment, wildlife and public health.

Keywords: Endocrine system, Sewage, Environmental pollution

INTRODUÇÃO

O conjunto de desreguladores endócrinos (DEs) dispensados no ambiente apresenta capacidade de interação com o sistema endócrino. Alguns estudos

denotam a que os DEs têm sido detectados em estações de tratamento de esgoto (ETEs) e em águas superficiais e subterrâneas, pelas suas remoções apenas parcialmente

* Contato: Aldo Pacheco Ferreira, Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, 21041-210, +55 (21) 25982814, e-mail: aldoferreira@ensp.fiocruz.br

durante o processo de tratamento e, por conseguinte, parte é descartada nos corpos receptores (Colborn et al., 1993; Bila et al., 2007). A exposição a estes produtos tem o potencial de afetar o sistema e desenvolvimento reprodutivo, assim como outros sistemas biológicos vitais para a saúde (Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Ferreira et al., 2006).

Segundo Alves et al. (2007), os DEs são capazes de provocar desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, de útero e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento de incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas tireóides, distúrbios nas funções do ovário, na fertilização e gravidez. Em animais, podem desregular a reprodução e o desenvolvimento dos organismos, assim como induzirem, irreversivelmente, características sexuais femininas em peixes machos, podendo levar à esterilização ou à redução da reprodução (Fox, 2001).

DE se define por associar-se a toda substância ou mistura de substâncias exógenas capaz de assumir função idêntica de um hormônio natural nos seres vivos ou inibir o funcionamento normal do mesmo, alterando as funções do sistema endócrino e causando efeitos adversos nos organismos ou em seus descendentes (Tapiero et al., 2002). Várias são as substâncias classificadas como DEs. Dentre elas se inserem: substâncias naturais (fitoestrogênios), substâncias químicas sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas e bisfenol A), estrogênios naturais (17 β - estradiol, estrona e estriol) e estrogênios sintéticos (17 α -etinilestradiol) (Ferreira et al., 2006).

Além dos DEs já conhecidos, muitos outros novos compostos são sintetizados anualmente e descarregados para o ambiente com consequências desconhecidas, e muitos potencialmente com atividade estrogênica. Com efeito, mais de 70 compostos químicos foram referidos como potenciais DEs. No entanto, estima-se que mais de 80.000 compostos químicos produzidos pelo homem sejam de uso corrente e por isso se encontrem nos efluentes de ETEs, assim como os seus produtos de degradação (Kolpin et al., 2002; Lee et al., 2005).

Os alquilfenóis polietoxilatos (APEs) são amplamente utilizados numa vasta diversidade de aplicações domésticas e comerciais, sendo utilizados como emulsionantes nos produtos de limpeza industriais e domésticos (Kolpin et al., 2002). Durante o tratamento de águas residuais urbanas e industriais, os APEs são degradados sucessivamente até formar menos biodegradáveis, como por exemplo, o nonilfenol (NP) e o octilfenol (OP), acabando por ser descarregados no ambiente aquático (Cheng et al., 2006).

De forma geral, as ETEs recebem os esgotos “in natura” e os submetem a uma série de processos físicos, químicos e biológicos que têm por objetivo eliminar da água contaminada as diversas substâncias indesejáveis nela contidas, possibilitando assim o seu retorno ao meio ambiente com características sanitárias mais adequadas (Bento et al., 2005; Falcioni et al., 2005; Ferreira et al., 2008). A informação disponível, relativamente ao efeito das descargas elevadas nos meios receptores e da sua

potencial toxicidade, nomeadamente em sistemas aquáticos é escassa. Além disso, há pouca informação sobre remoção de DEs em ETEs, circunstância que impede a realização de estimativas de balanços materiais. Deste modo, diversos bioensaios, assim como diversas técnicas analíticas têm sido empregadas com o intuito de identificar e averiguar a atividade de compostos potencialmente estrogênicos (Mara, 2003).

Os estrogênios, principalmente 17 β -estradiol que é responsável pela formação das características femininas e 17 α -etinilestradiol que é o principal estrogênio sintético encontrado nas pílulas anticoncepcionais e aplicado nas terapias de reposição hormonal, por possuírem alto potencial estrogênico, e têm sido classificados como os maiores responsáveis em provocar alterações endócrinas em organismos presentes em águas superficiais. Estes compostos vêm sendo detectados em efluentes de ETEs pelo fato de eliminá-los parcialmente durante o processo de tratamento (Moraes et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de DEs em ETEs da Penha e Ilha do Governador, de forma a avaliar o rendimento e a qualidade dos processos. Pretende-se, assim, subsidiar projetos futuros das ETEs, possibilitando o aperfeiçoamento do desempenho e monitoramento, repercutindo num melhor controle do processo e a redução de potenciais impactos causados no ambiente por DEs.

Desreguladores Endócrinos: Aspectos de enquadramento e definições

Os primeiros estudos que relacionaram o efeito de determinados químicos em animais surgiram durante os anos 1950 e 1960 por Rachel Carson, que relacionou os impactos do Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) no ambiente e em animais (Carson, 1962). No entanto, a preocupação pública generalizada para os problemas da poluição só surgiu com a publicação do livro “Our stolen future: Are we threatening our fertility, intelligence and survival?”.

Nas últimas décadas foram realizados vários estudos que relacionam propriedades de desregulação endócrina de determinados compostos (naturais e produzidos pelo homem) principalmente em nível de atividade hormonal (Sumpter & Johnson, 2005). Além de não haver uma definição consensual para DEs, também não há consenso quanto aos métodos de determinação, quantificação, análise e ensaios nos vários tipos de organismos.

A escolha e o desenvolvimento apropriado para identificação e caracterização de compostos químicos que podem desregular o sistema endócrino são por si só, muito complicados. Por exemplo, o receptor deste tipo de compostos não segue as regras normais de toxicidade pelos níveis endógenos de hormônios que estão presentes no corpo. Os DEs podem atuar por meio de vias diferentes dos outros compostos, originando respostas distintas, mesmo quando presentes a concentrações extremamente baixas. Por outro lado, há um grande número de testes disponíveis, muitos dos quais não são validados e são baseados numa gama de mecanismos completamente diferentes (Waissmann, 2002).

Com a constatação da existência de níveis significativos de compostos com capacidade de desregulação endócrina no ambiente, surgiu a necessidade de criação de uma definição de DEs. No entanto, todas as tentativas de definição de DEs incluem o conceito de desregulação ou disrupção - qualquer tipo de efeito (adverso ou não) no sistema endócrino.

Este fato está relacionado ao argumento de que pequenas alterações bioquímicas ou pequenas alterações em nível celular poderão provocar grandes danos em longo prazo. Na verdade, ocorrem sistematicamente alterações do sistema endócrino por fatores ambientais naturais e, por vezes, as pequenas perturbações provocadas pelos compostos antropogênicos descarregados no ambiente nem sequer provocam qualquer tipo de patologia. A questão será até que ponto ou até que concentração de compostos DEs é que cada indivíduo exposto consegue adaptar sem que para isso surja qualquer tipo de patologia. As consequências a esta exposição poder-se-ão manifestar também não só em nível de indivíduo exposto, mas também em nível de sua descendência, isto é, poderá haver efeitos e alterações em nível de população (Wang et al., 2005).

Identificação, Quantificação e Análise: Presença de DEs no Ambiente

De acordo com vários autores, há entre 50 a 70 compostos diferentes que foram identificados como sendo possíveis DEs (Matthiesen & Gibbs, 1998; Ishibashi et al., 2001). Contudo, à medida que mais compostos químicos são testados, o número dos que demonstram ter resposta estrogênica também aumenta, isto é, a lista de compostos considerados DEs está longe de estar fechada, não tendo parado de aumentar com a evolução da tecnologia e dos novos testes que têm surgido.

Uma das formas mais comuns de exposição dos organismos com os DEs é por meio do contato com a água contaminada de rios, baías, águas subterrâneas etc (Ferreira et al., 2006). Os DEs podem contaminar a água de várias formas: (a) Fontes pontuais – efluentes de estações de tratamento de águas residuais, efluentes de indústrias, efluentes da atividade agrícola, lixiviados etc; e (b) Fontes difusas – infiltração no solo de compostos utilizados na agricultura e indústria até atingirem os lençóis freáticos, recarga de aquíferos com água contaminada, fossas sépticas, espalhamento de lodo provenientes do tratamento de águas residuais, etc (Figura 1).

Os DEs, à semelhança de outros poluentes, têm grande variedade de fontes. Estas fontes podem ter implicações no ambiente (pela sua acumulação) e efeitos adversos para humanos e para todos os outros organismos vivos (Birkett & Lester, 2003).

As águas superficiais são particularmente vulneráveis à contaminação por DEs, pela sua proximidade com as fontes poluidoras e pelo seu baixo fator de diluição, o que origina elevado grau de exposição de todos os organismos que com elas contactam. Além disso, o tratamento realizado nas ETEs ainda é insuficiente (Ferreira et al., 2006). Este fato deve-se a que em determinados casos os produtos de degradação resultantes dos processos metabólicos presen-

presentes nas ETEs, geralmente, apresentam um poder estrogênico superior. Um exemplo deste fato são os compostos APEOs, que se degradam em NP. Estes, têm sido amplamente utilizados nos últimos 50 anos numa vasta diversidade de aplicações domésticas e comerciais (Tsuda et al., 2000), sendo usados como emulsionantes nos produtos de limpeza industriais e domésticos (Nichols et al., 2001). Durante o tratamento de águas residuais urbanas e industriais, os APEOs são degradados sucessivamente até formar menos produtos biodegradáveis, como por exemplo, o NP e o OP, acabando por ser descarregados no ambiente aquático (Maguire, 1999).

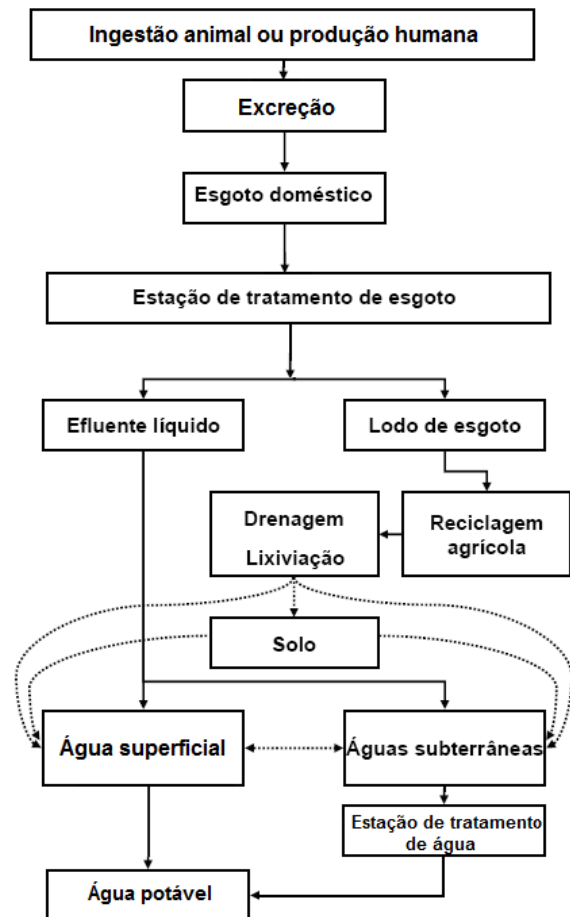


Figura 1. Potenciais rotas de exposição de hormônios humanos no ambiente

Adicionalmente, foi demonstrado que os alquifenóis (NP, OP) induzem a produção de vitelogenina em indivíduos machos de diversas espécies de peixes (Schwaiger et al., 2000). Outros contaminantes estrogênicos encontrados no meio aquático incluem o etinilestradiol, fitoestrogênicos, compostos organoclorados, entre outros susceptíveis de desregular o sistema endócrino de peixes e outros organismos.

O 17 β -estradiol é o principal estrogênio presente nos vertebrados, que nas fêmeas dos peixes regula o desenvolvimento e manutenção das gônadas e características sexuais somáticas e possui um papel crucial na vitelogênese (Ashfield et al., 1998). Por isso, o estudo

da sua concentração no meio e os efeitos ao nível do sistema endócrino dos peixes é da maior importância. Outro grande grupo de DEs são os metais pesados, como o cádmio, o chumbo e o mercúrio, que apesar de não interferirem com a atividade hormonal, quando presentes em concentrações elevadas, são tóxicos para as células gônadas dos peixes (Nelson et al., 2007). Algumas dessas substâncias tiveram seus usos proibidos ou não são mais produzidas, porém ainda podem ser encontradas no meio ambiente. Na Tabela 1 estão apresentadas as principais substâncias conhecidas de DEs.

Tabela 1. Substâncias principais com potencial de desregulação endócrina

Esteróides	Alquilfenóis	Compostos Poliaromáticos	Compostos	
			Orgânicos Oxigenados	Pesticidas
17 α -etinilestradiol	Nonilfenol	Bifenilas Policloradas (PCB)	Ftalatos	Atrazina
17 β -estradiol	Nonilfenol etoxilado	Retardantes de Chama	Bisfenol A	Linuron
Estrona	Octilfenol	Hidrocarbonetos Poliaromáticos (PAH)		Hexacloro-benzeno
Mestranol				Pentacloro-fenol (PCP)
tilestilbesterol (DES)				

Fonte: Bila et al. (2007)

Dentre os DEs, uma classe em especial tem chamado a atenção de alguns pesquisadores, são eles os estrogênios naturais e sintéticos que são encontrados no meio ambiente em concentrações na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} . Da mesma forma, têm sido encontrados presentes em cosméticos e anabolizantes utilizados em rações animais também são considerados DEs (Alves et al., 2007). Assim, podem-se dar alguns exemplos, tais como: bifenilas policloradas (PCBs), bisfenol A (BPA), dioxinas (PCDDs), furanos (PCDFs), DDT e compostos alquilfenóis-polietoxilatos, como OP e NP. BPA é um ingrediente comumente encontrado em diversos produtos utilizados em tratamentos dentários, como também em revestimentos internos de recipientes para embalagem de alimentos, o que é um facilitador à contaminação humana (Gascon et al., 1997; Stumpf et al., 1999). Os estrogênios naturais, estrona e o 17 β -estradiol são naturalmente e diariamente excretados na urina das mulheres, animais fêmeas e homens, e assim descartados no esgoto doméstico, bem como o 17 α -etinilestradiol que é um estrogênio sintético usado em pílulas anticoncepcionais (Bila et al., 2007). Na Tabela 2 é apresentada a excreção diária de estrogênios por humanos.

Tendo-se com foco principal estudar e avaliar o potencial estrogênico nas etapas de processo da ETEs da Penha e da Ilha do Governador, procedeu-se à determinação de alguns compostos DEs, tais como: alquilfenóis (nonilfenol e octilfenol), 17 β -estradiol e bisfenol A. Recolheram-se amostras ao longo da linha de tratamento das ETEs que, após processamento, foram analisadas por LC-MS/MS e ELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização das ETEs

As ETEs Penha e Ilha do Governador são submetidas aos seguintes parâmetros operacionais: pH, Sólidos suspensos

totais (SST), Sólidos suspensos fixos (SSF), Sólidos suspensos voláteis (SSV), Demanda química de oxigênio (DQO), Demanda bioquímica de oxigênio (DBO5), Nitrogênio total Kjeldahl, Nitrogênio amoniacal, Nitrato, Nitrito e Fósforo.

A ETE da Penha opera com biofiltros e lodos ativados, tratando uma vazão em torno de 1.600 L s⁻¹. A ETE da Ilha do Governador opera com lodos ativados, tratando uma vazão em torno de 525 L s⁻¹.

Tabela 2. Excreção diária (μg) per capita de estrogênios por humanos Fonte: Johnson *et al.* (2000)

	17 β -estradiol	Estrona	Estriol	17 α -etinilestradiol
Homens	1,6	3,9	1,5	-
Mulheres em idade fértil (10 a 49 anos)	3,5	8	4,8	-
Mulheres na menopausa (acima de 49 anos)	2,3	4	1	-
Gestantes	259	600	6000	-
Mulheres que tomam anticoncepcional	-	-	-	35

Amostragem

A amostragem foi feita ao longo da linha de tratamento da ETE Ilha do Governador e ETE Penha. Os pontos amostrados foram: (1) afluente, (2) pós-tratamento preliminar, (3) pós-tratamento primário e (4) efluente final. Amostras simples foram coletadas em triplicata e colocadas em frascos âmbar de 250 mL. Durante as 12h programadas para obtenção de amostras, o que se deu entre 8h e 20h, realizou-se a obtenção de oito amostras por ponto durante o período de coleta. As coletas nas ETEs foram realizadas durante o mês de março/2011 e os resultados exprimem o consolidado obtido de cada ponto analisado.

Análises laboratoriais

Após coleta, as amostras foram transportadas para o laboratório em malas térmicas refrigeradas, sendo em seguida filtradas por meio de uma malha de 230 μm para reter partículas maiores e, em seguida, em filtros de fibra de vidro Macherey-Nagel, MN GF -3, porosidade de 0,60 μm . A metodologia para o pré-tratamento das amostras e para a extração dos diferentes compostos foi desenvolvida para análise em Elisa (Ensaio imunoenzimático indireto) pela Takeda Chemical Industries Ltd. e para análise em LC-MS/MS (Liquid chromatography-mass spectrometry) (Petrovic et al., 2002).

Na análise por meio de Elisa, a extração de BPA, 17 β Estradiol e APE, foi efetuada utilizando colunas Oasis® HLB cartridge 3cc/60 mg 30 μm 100/box (WAT094226, Waters), sendo eluídas com 2 x 5.0 mL de CH₃OH a 10% para o BPA e APE, e com 2 x 5.0 mL de CH₃Cl₂ (100%) para o 17 β Estradiol. Posteriormente, as amostras foram concentradas até 2 mL com nitrogênio líquido. O esquema do processamento é demonstrado na Figura 2.

As análises por LC-MS/MS foram realizadas em um sistema Agilent 1100, com amostrador automático, acoplado ao espectrômetro de massas MDS/SCIEX

API2000 (Turbo Ion Spray®), com uma coluna de fase reversa - C18 (5 µm, 250 x 4 mm - LiChrospher 100 RP-18) e uma pré-coluna (4 x 4 mm, 5 µm - Merck, Darmstadt, Germany). O volume de injeção foi ajustado para 25 µl a um fluxo de 1 mL/min.

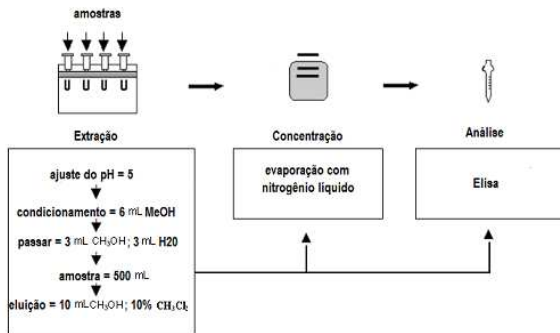


Figura 2. Esquema do processamento e análise das amostras

As determinações dos parâmetros físico-químicos tiveram os seguintes procedimentos: as leituras de pH foram efetuadas no local utilizando equipamento portátil (Digimed – DM/2P). As análises de SST, SSF, SSV, DQO, DBO5, N total Kjeldahl, N amoniacal, Nitrato, Nitrito e Fósforo foram feitas de acordo com as técnicas laboratoriais descritas no ‘Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater’ (AWWA, 1995).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram procedidas usando o pacote estatístico Origin 7.5 (OriginLab Corporation).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de DEs, a partir de análises dos efluentes coletados ao longo da linha de tratamento das ETE Penha e ETE Ilha do Governador são apresentados nas Tabela 3 e Tabela 4 com análises utilizando a metodologia LC-MS/MS; e nas Tabela 5 e Tabela 6, com análises utilizando a metodologia Elisa.

Os resultados obtidos por vários autores em suas investigações de 17β-estradiol em efluentes de ETEs na Alemanha (5,2 ng/L), Inglaterra (1,6 ng/L), Canadá (2 ng/L), EUA (6,5 ng/L) e Japão (0,5 ng/L) (Kuch & Ballschmitter, 2001; Xiao et al., 2001; Lee et al., 2005; Dorabawila & Gupta, 2005; Hashimoto et al., 2007) estiveram na faixa de 0,5 ng/L a 6,5 ng/L. Os resultados observados, neste presente trabalho com o método LC-MS/MS para o mesmo composto no efluente da ETE Penha, estiveram na média com a faixa de 0,18 ng/L a 0,77 ng/L (Xmin= 0,09 e Xmax= 1,11) e na ETE Ilha do Governador em média na faixa de 0,26 ng/L a 0,96 ng/L (Xmin= 0,15 e Xmax= 1,24). Entretanto, quando 17β-estradiol foi analisado por Elisa no efluente da ETE Penha detectou-se na faixa de 0,66 ng/L a 2,91 ng/L (Xmin= 0,43 e Xmax= 3,77) e no efluente da ETE Ilha do Governador na faixa de 0,41 ng/L a 3,23 ng/L (Xmin= 0,21 e Xmax= 5,67). Como os outros investigadores não obtiveram seus dados com Elisa, pelos resultados aqui apresentados, foi observado uma diferença estatisticamente significativa (p<0,016), denotando melhor resultado, e estes apontam

teores maiores próximos aos resultados da Alemanha e EUA, e maiores dos observados na Inglaterra, Canadá e Japão.

Em relação ao BPA, os resultados encontrados com o método LC-MS/MS no efluente da ETE Penha estiveram na média com a faixa de 1,05 µg/L a 4,44 µg/L (Xmin= 0,71 e Xmax= 5,31) e na ETE Ilha do Governador em média na faixa de 0,41 µg/L a 1,77 µg/L (Xmin= 0,22 e Xmax= 2,77). Quando analisado por Elisa no efluente da ETE Penha detectou-se na faixa de 1,34 µg/L a 5,13 µg/L (Xmin= 0,75 e Xmax= 8,35) e no efluente da ETE Ilha do Governador na faixa de 0,72 µg/L a 3,32 µg/L (Xmin= 0,27 e Xmax= 5,81). Também se observaram resultados com diferença significativa de método (p<0,022), denotando melhor resultado as análises feitas por Elisa. O BPA é um composto empregado em diversas atividades industriais atuando como constituinte de várias resinas epóxi. No ambiente, este composto apresenta elevada persistência. Os valores determinados nos efluentes das duas ETEs estão na faixa encontrada por Heisterkamp et al. (2004) que detectaram em amostras de ETEs concentrações entre 0,085 e 28 µg/L, mas o efluente final destas teve em média 6,09 µg/L, apresentando valores superiores aos encontrados nesta pesquisa.

Em relação ao APEOs (NP e OP), os resultados encontrados com o método LC-MS/MS no efluente da ETE Penha estiveram na média com a faixa de 10,34 µg/L a 52,76 µg/L (Xmin= 8,19 e Xmax= 63,84) e na ETE Ilha do Governador em média na faixa de 5,15 µg/L a 32,15 µg/L (Xmin= 3,03 e Xmax= 47,23). Quando analisado por Elisa no efluente da ETE Penha, detectou-se na faixa de 13,11 µg/L a 65,32 µg/L (Xmin= 3,99 e Xmax= 106,76) e no efluente da ETE Ilha do Governador na faixa de 10,17 µg/L a 45,10 µg/L (Xmin= 3,13 e Xmax= 78,34). Nos últimos 50 anos, os APEOs foram amplamente utilizados em variadas aplicações industriais, comerciais e domésticas, com uma produção anual da ordem de 350 000 toneladas, nos EUA, Europa e Japão, o que certamente justifica a sua presença nas ETEs (Nichols et al., 2001). Por este motivo, há uma preocupação crescente sobre o uso indiscriminado destes compostos, principalmente pela relativa estabilidade de alguns metabólitos e degradação de produtos contendo APEOs (Tsuda et al., 2000). Os resultados obtidos por Elisa são superiores aos obtidos por LC-MS/MS.

Em todas as análises ficou demonstrado maior sensibilidade ao método Elisa na detecção de DEs. Cabe destacar que pelo elevado número de técnicas existentes no mercado para análise de DEs, optou-se por testar estas duas técnicas de relativa acessibilidade e alta reprodutibilidade, de modo a poder dar subsídios na pesquisa de DEs e contribuir em se ter maior confiabilidade nas conclusões retiradas com o estudo. Porém, em todos os casos, ou seja, independentemente da técnica analítica usada (Elisa, LC-MS/MS), ficou demonstrado que os DEs selecionados estavam presentes nos efluentes das ETEs, variando as suas concentrações de composto para composto, sendo estes descarregados na Baía de Guanabara, com níveis de concentrações que poderão causar efeitos fisiológicos na vida animal (Colborn et al., 1993; Ferreira et al., 2006). Mas, pelo

Tabela 3. Análises de concentrações de DEs por LC-MS/MS no efluente da ETE Penha

ETE Penha (Método LC-MS/MS)											
Análises											
X	Sd(yEr±)	Se(yEr±)	P ₂₅	P ₇₅	P ₉₅	X _{min}	X _{max}	R	Median	Var	CoefVar
0,77	0,20708	0,07322	0,61	0,88	1,11	0,56	1,11	0,55	0,7	0,04288	0,26764
0,65	0,19241	0,06803	0,48	0,68	1,04	0,46	1,04	0,58	0,63	0,03702	0,29264
0,92	0,19456	0,06879	0,72	1,07	1,19	0,69	1,19	0,5	0,925	0,03786	0,21006
0,18	0,04422	0,01563	0,16	0,21	0,23	0,09	0,23	0,14	0,185	0,00196	0,24397
4,44	0,91526	0,32359	3,37	5,14	5,31	2,78	5,31	2,53	4,68	0,8377	0,20608
2,12	0,5646	0,19962	1,86	2,54	2,64	0,98	2,64	1,66	2,21	0,31877	0,26585
2,72	0,6904	0,24409	2,14	2,81	4,05	1,79	4,05	2,26	2,705	0,47666	0,25382
1,05	0,31802	0,11244	0,89	1,04	1,79	0,71	1,79	1,08	0,99	0,10114	0,30216
52,76	7,47733	2,64363	45,86	59,27	63,84	44,89	63,84	18,95	49,395	55,91039	0,14172
69,94	6,42292	2,27085	63,67	76,12	78,25	62,77	78,25	15,48	69,29	41,25396	0,09182
47,08	6,93132	2,45059	42,33	51,19	57,48	37,38	57,48	20,1	45,49	48,04316	0,1472
10,34	2,10333	0,74364	8,45	11,58	13,86	8,19	13,86	5,67	9,78	4,42401	0,20339

X-arithmetic mean; Sd- standard deviation; Se- standard error; P₂₅ – Percentile 25; P₇₅ – Percentile 75; P₉₅ – Percentile 95; X_{min}- minimum; X_{max}-maximum; R – Range; Var – Variance; CoefVar- coefficient of variation (%)

Tabela 4. Análises de concentrações de DEs por LC-MS/MS no efluente da ETE Ilha do Governador

ETE Ilha do Governador (Método LC-MS/MS)											
Análises											
X	Sd(yEr±)	Se(yEr±)	P ₂₅	P ₇₅	P ₉₅	X _{min}	X _{max}	R	Median	Var	CoefVar
0,96	0,22605	0,07992	0,71	1,19	1,24	0,68	1,24	0,56	0,92	0,0511	0,23516
1,02	0,26259	0,09284	0,67	1,17	1,33	0,64	1,33	0,69	1,12	0,06896	0,25713
1,11	0,25182	0,08903	0,91	1,2	1,58	0,82	1,58	0,76	1,06	0,06341	0,22661
0,26	0,06413	0,02267	0,22	0,31	0,34	0,15	0,34	0,19	0,265	0,00411	0,24314
1,77	0,53973	0,19082	1,28	1,96	2,77	1,26	2,77	1,51	1,575	0,29131	0,30429
1,94	0,76859	0,27174	1,39	2,31	3,08	0,66	3,08	2,42	1,815	0,59074	0,39567
0,78	0,22564	0,07978	0,6	0,86	1,17	0,46	1,17	0,71	0,77	0,05091	0,28928
0,41	0,15682	0,05544	0,23	0,51	0,67	0,22	0,67	0,45	0,39	0,02459	0,38017
32,15	10,79091	3,81516	21,69	38,69	47,23	18,64	47,23	28,59	31,44	116,44367	0,33563
25,55	8,94666	3,16312	16,57	31,31	38,45	15,33	38,45	23,12	24,895	80,0428	0,35011
29,08	10,20934	3,60955	18,78	35,62	43,81	17,43	43,81	26,38	28,33	104,23056	0,35105
5,15	1,91314	0,6764	3,17	6,44	7,91	3,03	7,91	4,88	5,1	3,66009	0,37148

X-arithmetic mean; Sd- standard deviation; Se- standard error; P₂₅ – Percentile 25; P₇₅ – Percentile 75; P₉₅ – Percentile 95; X_{min}- minimum; X_{max}-maximum; R – Range; Var – Variance; CoefVar- coefficient of variation (%)

Tabela 5. Análises de concentrações de DEs por Elisa no efluente da ETE Penha

ETE Penha (Método Elisa)											
Análises											
X	Sd(yEr±)	Se(yEr±)	P ₂₅	P ₇₅	P ₉₅	X _{min}	X _{max}	R	Median	Var	CoefVar
2,91	0,67324	0,23803	2,17	3,37	3,77	2,02	3,77	1,75	3,07	0,45326	0,23136
2,57	0,59464	0,21024	1,92	2,96	3,32	1,77	3,32	1,55	2,71	0,3536	0,23138
2,13	0,58674	0,20745	1,86	2,54	2,76	0,95	2,76	1,81	2,21	0,34427	0,27531
0,66	0,22335	0,07897	0,43	0,68	1,09	0,43	1,09	0,66	0,625	0,04989	0,33841
5,13	1,96571	0,69498	2,88	6,38	8,35	2,68	8,35	5,67	4,85	3,86403	0,38318
2,74	1,03593	0,36626	1,58	3,39	4,43	1,41	4,43	3,02	2,585	1,07316	0,37825
2,36	0,91872	0,32482	1,32	2,92	3,89	1,21	3,89	2,68	2,235	0,84406	0,38867
1,34	0,51826	0,18323	0,75	1,66	2,21	0,71	2,21	1,5	1,255	0,26859	0,38604
65,32	25,63814	9,06445	36,42	80,86	106,76	31,62	106,76	75,14	62,78	657,31427	0,39249
61,91	24,75357	8,75171	34,22	76,54	102,49	30,09	102,49	72,4	58,43	612,73913	0,39984
51,12	19,55092	6,9123	28,5	63,21	84,03	27,26	84,03	56,77	48,33	382,23864	0,38246
13,11	6,34904	2,24473	7,31	15,21	24,29	3,99	24,29	20,3	12,395	40,31037	0,48429

X-arithmetic mean; Sd- standard deviation; Se- standard error; P₂₅ – Percentile 25; P₇₅ – Percentile 75; P₉₅ – Percentile 95; X_{min}- minimum; X_{max}-maximum; R – Range; Var – Variance; CoefVar- coefficient of variation (%)

Tabela 6. Análises de concentrações de DEs por Elisa no efluente da ETE Ilha do Governador

ETE Ilha do Governador (Método Elisa)											
Análises											
X	Sd(yEr±)	Se(yEr±)	P ₂₅	P ₇₅	P ₉₅	X _{min}	X _{max}	R	Median	Var	CoefVar
3,23	1,41932	0,5018	1,83	3,97	5,67	1,22	5,67	4,45	3,11	2,01446	0,43874
2,76	1,05107	0,37161	1,54	3,41	4,49	1,47	4,49	3,02	2,61	1,10474	0,38082
1,45	0,41074	0,14522	1,23	1,73	1,9	0,64	1,9	1,26	1,48	0,16871	0,28376
0,41	0,10849	0,03836	0,35	0,49	0,54	0,21	0,54	0,33	0,42	0,01177	0,26221
3,32	1,45969	0,51608	1,88	4,08	5,81	1,23	5,81	4,58	3,195	2,1307	0,43983
2,29	1,08775	0,38458	1,37	2,81	4,03	0,56	4,03	3,47	2,2	1,18319	0,47552
1,38	0,61557	0,21764	0,78	1,69	2,45	0,51	2,45	1,94	1,325	0,37893	0,44566
0,72	0,31842	0,11258	0,41	0,89	1,27	0,27	1,27	1,00	0,695	0,10139	0,44072
45,10	19,56435	6,91704	28,19	55,55	78,34	15,19	78,34	63,15	43,52	382,76391	0,43375
40,13	18,21837	6,44117	22,81	49,47	71,15	13,22	71,15	57,93	38,75	331,90908	0,45403
33,45	14,94038	5,28222	18,31	41,23	58,89	12,17	58,89	46,72	32,295	223,21505	0,44668
10,17	4,73662	1,67465	5,76	12,53	18,33	3,13	18,33	15,2	9,805	22,43554	0,46552

X-arithmetic mean; Sd- standard deviation; Se- standard error; P₂₅ – Percentile 25; P₇₅ – Percentile 75; P₉₅ – Percentile 95; X_{min}- minimum; X_{max}-maximum; R – Range; Var – Variance; CoefVar- coefficient of variation (%)

elevado nível de diluição existente nesta baía, espera-se que os efeitos nos organismos não sejam relevantes e/ou imediatos.

Na Tabela 7 e na Tabela 8, indicam-se os valores relativos aos parâmetros físico-químicos operacionais de controle de tratamento nas ETEs Penha e Ilha do Governador, respectivamente. O comportamento dos parâmetros no processo de tratamento foi condizente com o esperado, indicando alta eficiência do processo nas ETEs analisadas. Cabe destacar que nos parâmetros-chave em que se baseia o Conama 357, os resultados atendem, tais como, o pH na faixa entre 5 e 9, até 60 mg/L de DBO e N amoniacal até 20 mg/L.

Os resultados da pesquisa demonstram que apesar da eficiência das ETEs, há necessidade de procedimentos adicionais na etapa final do processo, visando reduzir a níveis seguros os teores de DEs. Dados da literatura sobre a eficiência da remoção de estrogênios em ETEs reforçam posicionamento sobre a necessidade de tratamentos adicionais a serem aplicados no efluente tratado (Lopes et al., 2008). Segundo Andersen et al. (2003), com base em seu estudo realizado no estado do Arkansas (EUA) denotaram que a remoção de DEs foi mais eficiente nos processos em que ocorreu a remoção de nutrientes, ou seja, o tratamento terciário responsável pela remoção de nitrogênio e fósforo. Nesse caso, o lodo apresentava tempo de detenção de 11 a 13 dias e ocorreu a multiplicação de microrganismos capazes de degradar os estrogênios, fato que não ocorre em processos convencionais com tempo de detenção do lodo menor que quatro dias.

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos apresentados nos pontos amostrados da ETE Penha e ETE Ilha do Governador

Parâmetro	ETE Penha				Eficiência (%)
	Pontos de amostragem				
	1	2	3	4	
pH	6,62	6,78	6,45	6,87	-
SST (mg/L)	4.265,2	1.910,7	108,6	92,1	97,8
SSF (mg/L)	964,5	267,7	132,8	35,9	96,27
SSV (mg/L)	3.198,3	1.625,8	121,8	41,0	98,71
DQO (mg O ₂ /L)	25.460	18.636	254	233	99,08
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	5.745	3.567	566	58	98,99
N Total Kjeldahl (mg N/L)	333,7	165,9	13,1	11,8	96,46
N Amoniacal (mg N-NH ₃ /L)	84,8	61,6	21,4	4,5	94,6
Nitrato (mg NO ₃ /L)	188,6	22,1	3,5	1,7	90,98
Nitrito (mg NO ₂ /L)	123,2	16,7	1,7	0,5	95,94
Fósforo total (mg P/L)	4,41	4,78	2,67	2,34	46,93

O presente trabalho mostrou que as concentrações dos compostos estudados encontrados nos efluentes das ETEs apresentam-se em níveis preocupantes em relação aos teores de DEs presentes nos efluentes de ETE de alguns países (Alemanha, Inglaterra, Canadá, EUA e Japão), reflexo da necessidade de pesquisarmos e implementarmos maior controle nas ETEs fortalecendo o saneamento básico do país, e assim minimizando impactos significativos ao ambiente.

As técnicas analíticas utilizadas neste trabalho possibilitaram comparar os valores dos DEs nas diferentes etapas do processo das ETEs. Os dados obtidos por Elisa apresentam-se com elevada detectabilidade e seletividade em relação ao método LC-MS/MS, com maior sensibilidade

de para os DEs e, por conseguinte apresentaram limites de detecção melhores. Os parâmetros de validação verificados para o procedimento proposto aumentaram a confiabilidade dos resultados apresentados, uma vez que ainda não se tem um método oficial para a determinação simultânea desses compostos. Esse procedimento poderá ainda servir como base para se iniciar estudos de monitoramento desses compostos em efluentes.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos apresentados nos pontos amostrados da ETE Ilha do Governador

Parâmetro	ETE Ilha do Governador				Eficiência (%)
	Pontos de amostragem				
	1	2	3	4	
pH	6,34	6,43	6,77	6,93	-
SST (mg/L)	5.642,7	1.455,3	67,9	48,2	99,1
SSF (mg/L)	678,9	199,4	111,1	24,4	96,4
SSV (mg/L)	2.433,7	1.322	87,3	22,2	99,08
DQO (mg O ₂ /L)	18.453	12.642	278	151	99,18
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	5.997	6.622	475	44	99,26
Total Kjeldahl (mg N/L)	452,3	177,6	16,7	10,2	97,74
N Amoniacal (mg N-NH ₃ /L)	112,5	48,7	19,8	7,6	93,24
Nitrato (mg NO ₃ /L)	231,4	77,2	4,1	1,5	93,51
Nitrito (mg NO ₂ /L)	98,2	22,6	2,4	0,3	96,94
Fósforo total (mg P/L)	3,77	2,15	1,87	0,87	76,92

Uma política adequada para reduzir a ameaça de substâncias químicas que alteram o sistema hormonal requer controle sobre a disponibilização e orientações de uso de pesticidas como o endossulfan e metoxicloro, fungicidas como vinclozolina, herbicidas como atrazina, os alquilfenóis, os ftalatos e BPA. Para evitar a geração de dioxinas faz-se primordial a eliminação gradual de PVC, o tetracloroetileno e de inseticidas clorados.

CONCLUSÃO

Este trabalho contribui para o entendimento de um tema pouco estudado no país, o qual gerou dados que permitiram conhecer o tratamento e a presença de DEs em duas importantes ETEs. Pela importância das substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino é necessário continuar com os estudos sobre metodologias de detecção e ações dos DEs no ambiente e no sistema reprodutivo da fauna presente nos rios. Fato positivo, o Brasil já vislumbra com políticas públicas que possam nos colocar em nível de igualdade aos países europeus e EUA, no que se refere ao controle de DEs em ETEs.

AGRADECIMENTOS

À Faperj (E-110-328/2011) e ao CNPq (CNPq (302946/2011-0) pelo suporte financeiro da pesquisa.

REFERÊNCIAS

Alves C, Flores LC, Cerqueira TS, Toralles MBP. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com actividade estrogénica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. Cad. Saúde Pública, 23(5): 1005-1014, 2007.

Andersen H, Siegrist, H, Halling-Sorensen B, Ternes T. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant.

- Environmental Science and Technology, 37(18): 4021-4026, 2003.
- Ashfield AL, Pottinger TG, Sumpter JP. Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. Environ. Toxicol. Chem., 17(3): 679-686, 1998.
- AWWA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. Washington. 1995, 1368p.
- Bento AP, Sezerino PH, Philippi LS, Reginatto V, Lapolli FR. Caracterização da microfauna em estação de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. Eng. Sanit. Amb., 10(4): 329-338, 2005.
- Bila, D.M.; Montalvão, A.F.; Azevedo, D.A.; Dezotti, M. Estrogenic activity removal of 17 β -Estradiol by ozonation and identification of by-products. Chemosphere, 69: 736-746, 2007.
- Birkett JW, Lester JN. Endocrine disrupter in wastewater and sludge treatment process, IWA Publishing, 2003, 312p.
- Carson R. Silent Spring. Houghton Mifflin Company, Boston, 1962, 378p.
- Cheng CY, Wu CY, Wang WH, Ding WH. Determination and distribution characteristics of degradation products of nonylphenol polyethoxylates in the rivers of Taiwan. Chemosphere, 65: 2275 - 2281, 2006.
- Colborn T, Von-Saal F, Soto A. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Perspectives, 101: 378-84, 1993.
- CONAMA. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Conama 357, 2005, 23p.
- Dorabawila N, Gupta G. Endocrine Disrupter-Estradiol-in Chesapeake Bay Tributaries. Journal of Hazardous Materials A, 120: 67-71, 2005.
- Falcioni T, Manti A, Boi P, Canonico B, Balsamo M, Papa S. Enumeration of activated sludge bacteria in a wastewater treatment plant. J. Biol. Regulators and Homeostatic Agents, 19(3-4): 176-179, 2005.
- Ferreira AP, Cunha CLN, Kling ASM. Disruptores endócrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. Revista Biomédica, 17: 146-150, 2006.
- Ferreira AP, Cunha CLN, Roque OCC. Avaliação da microfauna no efluente final para monitoramento da qualidade ambiental em estações de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados. Gaia Scientia, 1(2): 51-58, 2008.
- Fox GA. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes - St. Lawrence basin. Environ. Health Perspectives, 109: 853-861, 2001.
- Gascon J, Oubina A, Barcelo D. Detection of endocrine disrupting pesticides by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Application to atrazine. Trends in Analytical Chemistry, 16: 554-562, 1997.
- Hashimoto T, Onda K, Nakamura Y, Tada K, Miya A, Murakami T. Comparison of natural estrogen removal efficiency in the conventional activated sludge process and the oxidation ditch process”, Water Research, 41: 2117-2126, 2007.
- Heisterkamp I, Ganrass J, Ruck W. Biossay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples. Anal. Bioanal. Chem., 378: 709-715, 2004.
- Ishibashi H, Tachibana K, Tsuchimoto M, Soyano K, Ishibashi Y, Nagae M, Kohra S, Takao Y, Tominaga N, Arizono K. In vivo testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (Carassius auratus). J. Health Science, 47(2): 213-218, 2001.
- Johnson AC, Belfroid A, Di Corcia A. Estimating Steroid Oestrogen Inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. Sci. Total Environ., 256: 163-173, 2000.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environ. Sci. Technol., 36(6): 1202-1211, 2002.
- Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC- (NCI)-MS in the picogram per liter range. Environ. Sci. Technol., v. 35, n. 15, p. 3201-3206, 2001.
- Lee HB, Peart TE, Svoboda ML. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1094: 122-129, 2005.
- Lopes LG, Marchi MRR, Souza JBG, Moura JA. Hormônios estrogênicos no ambiente e eficiência das tecnologias de tratamento para remoção em água e esgoto. Rev. Bras. Recursos Hídricos, 13(4): 123-131, 2008.
- Maguire RJ. Review of the persistence of nonylphenol and ethoxylates in aquatic environments. Water Qual. Res. J. Can., 34(1): 37-78, 1999.
- Mara DD. Water, sanitation and hygiene for the health of developing nations. Public Health, 117(6): 452-456, 2003.
- Matthiessen P, Gibbs PE. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs. Environ. Toxicol. Chem., 17(1): 37-43, 1998.
- Moraes NV, Grando MD, Valerio DAR, Oliveira DP. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. Rev. Bras. Toxicol., 21(1): 1-8, 2008.
- Nelson J, Bishay F, Van Roodselaar A, Ikonomou M, Law FCP. The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. Sci. Total Environ., 374: 80-90, 2007.

Nichols KM, Snyder EM, Snyder A, Pierens SL, Miles-Richardson SR, Giesy JP. Effects of nonylphenol ethoxylate on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 20, n. 3, p. 510-522, 2001.

Petrovic M, Eljarrat E, Lopes de Alda MJ, Barceló D. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J. Chromatogr. A*, 974(1-2): 23-51, 2002.

Rodriguez-Mozaz S, Alda MJL, Barcelos D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1045: 85-92, 2004.

Schwaiger J, Spieser OH, Bauer C, Ferling H, Mallow U, Kalbfus W, Negele RD. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.*, 51: 69-78, 2000.

Sumpter JP, Johnson A.C. Lessons learned from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 4321-4332, 2005.

Stumpf M, Terns TA, Wilken R, Rodrigues SV, Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural water in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.*, v. 225, p. 135-141, 1999.

Tapiero H, Nguyen-Ba G, Tew KD. Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 36-44, 2002.

Tsuda T, Suga K, Kaneda E, Ohsuga M. Determination of 4-nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 746: 305-309, 2000.

Waissmann W. Vigilância sanitária e desreguladores endócrinos. *Cad. Saúde Pública*, 18(2): 511-517, 2002.

Wang Y, Hu W, Cao Z, Fu X, Zhu T. Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China. *Anal. Bioanalytical Chem.*, 383: 857-863, 2005.

Xiao XY, Mccalley DV, Mcevoy J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 932: 195-204, 2001.