

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS

***OCORRÊNCIA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM CULTURA DE
MILHO IRRIGADA COM EFLUENTES URBANOS TRATADOS***

CARMEN MARIA BARROS DE CASTRO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Luiz Olinto Monteggia

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Nilza Maria dos Reis Castro (IPH/UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Ruaro Peralba (DQI/IQ/UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Vanusa Regina Lando (Depto. de Ciências Básicas da Saúde/ UFCSPA)

Porto Alegre, 19 novembro de 2010

O presente trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Luiz Olinto Monteggia

“Os bons e os maus resultados dos nossos ditos e obras vão se distribuindo, supõe-se que de uma maneira bastante uniforme e equilibrada, por todos os dias do futuro, incluindo aqueles infindáveis, em que já cá não estaremos para poder comprová-lo, para congratularmo-nos ou para pedir perdão, aliás, há quem diga que é isto a imortalidade de que tanto se fala.”

(José Saramago)

Dedico este trabalho a meus pais,
Ao meu marido Aquiles e aos meus filhos Thiago e Clarissa

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e aos meus filhos, companheiros de todas as horas, pelo amor compreensão e convivência.

Aos demais familiares e amigos, em especial à minha cunhada Nara, pelo incentivo e bons momentos.

Aos colegas do Laboratório de Saneamento pelo apoio técnico, mas principalmente pela amizade e afeto.

Aos colegas do Instituto de Pesquisas Hidráulicas, em particular à amiga Nilza pelo incondicional apoio e carinho e ao colega Louzada pela oportunidade e eterno bom humor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar esta pesquisa

À Mara, companheira e amiga de longa jornada, pela paciência e colaboração

À querida colega Liana pelo acolhimento e carinho.

Ao André, grande parceiro, cujo conhecimento e dedicação viabilizaram este trabalho

Ao Tiago, pelas valiosas idéias e boas conversas

À Vera, pelo zeloso e fundamental apoio na limpeza e organização dos materiais de análise

À Susan pela colaboração nas análises

Ao Sílvio pelo auxílio nas coletas e atividades de campo.

Ao Oswaldo e ao Roberlaine pelos ensinamentos e colaboração no trabalho de colheita

Aos bolsistas Giovanni, Cecília, Verônica e William que em diferentes momentos me deram o suporte técnico para prosseguir neste trabalho.

À colega, Beatriz, assessora administrativa deste Instituto pelo empenho e esforço para atender minhas demandas.

Às colegas Kátia (Instituto de Biociências) e Cynthia (Faculdade de Farmácia) pelo estímulo e companheirismo.

À direção deste Instituto pela disponibilização de recursos.

Ao meu orientador, pelos ensinamentos e conselhos.

À Nadir e Lygia pela amizade e incentivo.

Ao Carlos André pela valiosa colaboração

Ao Andreas pelo apoio e atenção

Aos colegas de curso, em particular à Viviane pela alegria contagiante.

As colegas da biblioteca (Jussara, Jussara, Sandra e Beth) pelo auxílio.

A todos os colegas deste Instituto pela confiança, motivação e apoio.

Ao povo brasileiro.

SUMÁRIO

I - LISTA DE TABELAS	XII
II - LISTA DE FIGURAS	XIII
III - LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIV
IV – RESUMO	XVI
V – ABSTRACT	XVII
1 – INTRODUÇÃO	18
2 - RELEVÂNCIA DO TEMA	20
3 - HISTÓRICO E ESTADO ATUAL DO CONHECIMENTO	22
4 – OBJETIVOS	25
5 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
5.1 – OS DIFERENTES USOS DAS ÁGUAS RESIDUÁRIAS	26
5.1.1 - UTILIZAÇÃO DE ESGOTOS TRATADOS EM IRRIGAÇÃO	27
5.2 - OS DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MEIO AMBIENTE	29

5.2.1 - OS DESREGULADORES ENDÓCRINOS E A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	32
5.2.2 - SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO DESREGULADORES ENDÓCRINOS	33
5.3 - HORMÔNIOS ESTERÓIDES DE INTERESSE AMBIENTAL	34
5.3.1 - PRINCIPAIS MEIOS DE EXPOSIÇÃO E DESTINO AMBIENTAL ..	38
5.3.2 - OCORRÊNCIA DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM ALIMENTOS	42
5.3.3 - EFEITOS SOBRE O MEIO AMBIENTE	44
5.3.3.1 - EFEITOS RELATADOS EM ANIMAIS SILVESTRES E DE LABORATÓRIO	45
5.3.3.2 - EFEITOS RELATADOS EM HUMANOS	47
5.4 - NÍVEIS DE HORMÔNIOS NO MEIO AQUÁTICO E EM ESGOTOS DOMÉSTICOS	49
5.4.1 - ÁGUAS SUPERFICIAIS	49
5.4.2 - ESGOTOS DOMÉSTICOS	50
5.5 - TRATAMENTOS APLICADOS NA REMOÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM SISTEMAS AQUOSOS	53
5.6 - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTROGÊNIOS	54
6 - MATERIAIS E MÉTODOS	58
6.1 - CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO	58

6.1.1 - DESCRIÇÃO GERAL DA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL	58
6.1.2 - DESCRIÇÃO GERAL DO PROJETO DE FERTIRRIGAÇÃO	59
6.2 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	61
6.2.1 - EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E FILTROS	61
6.2.2 - SOLVENTES E REAGENTES	61
6.2.3 - PADRÕES ANALÍTICOS	61
6.2.4 – INSTRUMENTAÇÃO – EQUIPAMENTOS	62
6.3 - AMOSTRAS E SOLUÇÕES	62
6.3.1 - ESGOTO DOMÉSTICO	62
6.3.2 – AMOSTRAS DE MILHO	63
6.3.3 - ESGOTO SINTÉTICO	64
6.3.4 - SOLUÇÃO ESTOQUE E SOLUÇÃO PADRÃO	65
6.4 - PROCEDIMENTOS PARA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS POR SPE	65
6.4.1 – AMOSTRAS DE EFLUENTES DOMÉSTICOS	65
6.4.2 – AMOSTRAS DE MILHO	67
6.4.3 - ESGOTO SINTÉTICO	67
6.5 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	67
6.6 - AVALIAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	68
6.6.1 – SELETIVIDADE	68
6.6.2 - DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	68

6.6.3 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO	69
6.6.4 – AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO NÍVEL DE RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS DE INTERESSE PELO MÉTODO SPE	69
7 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
7.1 - DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	71
7.1.1 - SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA	71
7.1.2 - CONDIÇÕES OPERACIONAIS	72
7.2 - AVALIAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO	74
7.2.1 – SELETIVIDADE DO MÉTODO PROPOSTO	74
7.2.2 - DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	75
7.2.3 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO	76
7.2.4 – AVALIAÇÃO DE NÍVEL DE RECUPERAÇÃO DOS HORMÔNIOS DA MATRIZ DE ESGOTO SINTÉTICO PELA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA (SPE)	78
7.3 - QUANTIFICAÇÃO DE HORMÔNIOS NAS AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO E TRATADO E GRÃOS DE MILHO	81
7.3.1 - ESGOTO BRUTO	81
7.3.2 - EFLUENTES TRATADOS	83
7.3.3 – AMOSTRAS DE MILHO	84
8. CONCLUSÕES	86

9. RECOMENDAÇÕES	89
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas e toxicidade de hormônios Estrógenos	37
Tabela 2 - Excreção diária ($\mu\text{g}/\text{dia}$) per capita de estrogênios por humanos	39
Tabela 3 - Estimativa do consumo diário de hormônios esteróides através de dieta alimentar	43
Tabela 4 - Produção humana diária de hormônios estrógenos x ingestão diária	43
Tabela 5 - Concentração de hormônios estrógenos em águas superficiais	50
Tabela 6 - Concentração de hormônios esteróides em afluentes de ETE	52
Tabela 7 - Concentração de hormônios esteróides em efluentes de esgoto doméstico	53
Tabela 8 - Composição do esgoto sanitário sintético	64
Tabela 9 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos hormônios	76
Tabela 10 - Equações de regressão linear dos hormônios estudados	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos hormônios estrógenos	36
Figura 2 - Representação esquemática do modo de contaminação dos ecossistemas aquáticos por hormônios sexuais	40
Figura 3 - Parcelas experimentais do sistema de irrigação	60
Figura 4 - Fluxograma representativo da seqüência analítica adotada no procedimento de extração em fase sólida (SPE)	66
Figura 5 - Espectro do hormônio natural 17β -estradiol	72
Figura 6 - Cromatograma obtido para uma mistura de padrões, com concentração igual a 20 mg.L^{-1} de E1, E2 e EE2	73
Figura 7 - Cromatograma obtido do extrato branco de esgoto sintético	74
Figura 8 - Cromatograma obtido do extrato dopado de esgoto sintético	75
Figura 9 - Curva de calibração obtida para o hormônio natural estrona (E1)	77
Figura 10 - Níveis percentuais de recuperação dos analitos de interesse	79
Figura 11 - Cromatograma obtido para amostras de grão de milho – canteiro T3	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEC – Commission of the European communities (Comissão das Comunidades Européias)
CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
C₁₈ – Octadecilsilano
DAD – Detector de arranjo de diodos
DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DES – Dietilestilbestrol
DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgoto
EDC – Endocrine Disrupting Chemical
E1 – estrona
E2 - 17 β -estradiol
EE2 - 17 α -etinilestradiol
E3 – estriol
EB – Efluente bruto
EL – Efluente da lagoa de polimento
EUASB – efluente do reator UASB
EPA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
ETE – Estação de Tratamento de Esgotos
EU – European Union (União Européia)
EUA – Estados Unidos da América
HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alto desempenho)
IPCS – International Program Chemical Security (Programa Internacional de Segurança Química)
IPH/UFRGS – Instituto de Pesquisas Hidráulicas/Universidade Federal do Rio Grande do Sul
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
LC/MS – Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas
LC/MS/MS - Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas/massas
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação

ng - nanogramas

ODCE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – potencial hidrogeniônico

SPE – Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Digestor anaeróbio de fluxo descendente)

USEPA – United State Environmental Protection Agency (Agência de Prteção Ambiental dos Estados Unidos)

UV-Vis – Detector ultravioleta-visível

VTG - vitelogenina

RESUMO

Devido à escassez de recursos hídricos, efluentes de plantas de tratamento de águas residuárias têm sido reutilizadas ou recicladas em todo o mundo. Em algumas regiões áridas e em particular em regiões semi-áridas, o reuso de água tem sido reconhecido como um valioso recurso. Entretanto, dependendo da natureza do uso, surgem preocupações sobre potenciais riscos associados à presença de patógenos e contaminantes e a saúde humana. Uma grande variedade de contaminantes orgânicos pode estar presente nos esgotos domésticos e ser recirculado pelo ambiente. Alguns desses compostos apresentam o potencial de desregular as funções normais do sistema endócrino dos organismos e assim, causar efeitos adversos sobre a saúde humana. Entre esses compostos, incluem-se os hormônios estrógenos naturais e sintéticos.

Nesse trabalho, desenvolvido na Estação Experimental de Tratamento de Águas Residuárias Urbanas do IPH/UFRGS, localizada nas dependências da ETE São João – Navegantes / DMAE / Porto Alegre / RS, foi investigada a ocorrência de hormônios naturais e sintéticos em grãos de milho cultivados por processo de irrigação por sulcos com efluentes domésticos tratados.

O método analítico utilizado para quantificação dos hormônios de interesse foi a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

Os resultados obtidos confirmam a presença de hormônios naturais e sintéticos no esgoto bruto e nos efluentes tratados, mas em concentrações extremamente baixas e não indicam processo de transferência ou acúmulo desses contaminantes para os grãos de milho.

Palavras-chaves: hormônios, compostos desreguladores endócrinos, esgotos domésticos, reuso de água, irrigação por sulcos, *Zea mays*.

ABSTRACT

Due to the scarcity of fresh water resources, effluents from wastewater treatment plants have increasingly been reclaimed and reused around the world. In some arid and semi-arid regions, in particular, reclaimed water has been recognized as a valuable resource for non-potable use such as irrigating crops. However, depending on the nature of application, there is concern about potential risks associated with pathogens and organic contaminants to the environment and human health. A wide range of organic contaminants may be present in wastewater and the environment receiving it. These include natural and synthetic estrogens have the potential to disrupt the normal function (s) of endocrine systems in organisms and thus causing health effects on wildlife and humans.

In the present work, developed at “Estação Experimental de Tratamento de Águas Residuárias Urbanas do IPH/UFRGS”, located on the ETE São João – Navegantes /DMAE / Porto Alegre /RS, was investigated the occurrence of natural and synthetic hormones in corn's grain (*Zea mays*) cultivated by furrow irrigation of treated domestic effluents. The analytic method used for the hormones quantification was the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results confirm the presence of natural and synthetic hormones on the untreated and treated effluents, although with a very low concentration and not indicated accumulation of this one to the corn's grain.

Keywords: hormones, endocrine disrupting compounds, sewage, reclaimed water, furrow irrigation, *Zea mays*.

1 - INTRODUÇÃO

O uso de efluentes tratados na agricultura pode se constituir, não só, em instrumento poderoso para restaurar o equilíbrio entre a oferta e demanda de água em diversas regiões brasileiras, mas também como uma alternativa à crescente necessidade de produção de alimentos sem a aplicação de fertilizantes sintéticos.

Os regulamentos e códigos de prática para esta atividade, já estabelecidos em alguns países, fundamentam-se tão somente, em critérios microbiológicos decorrentes do risco potencial associado à presença de organismos patogênicos nos esgotos, no solo ou nas culturas irrigadas. No entanto, os poluentes químicos devem ser considerados de forma diferenciada dos contaminantes microbiológicos, principalmente pelo fato de que podem ser incorporados aos tecidos das plantas, através da adsorção pelas raízes.

Organizações mundiais, como a Agência Européia dos Produtos Químicos (ECHA), indicam que atualmente mais de 100.000 produtos químicos são utilizados rotineiramente nos diversos setores associados às atividades da sociedade moderna como indústria, agricultura e construção entre outros. Uma grande parte dessa imensa variedade de elementos, compostos e produtos se integra às águas residuárias, entre esses, incluem-se uma variedade de compostos orgânicos naturais e sintéticos, denominadas genericamente como perturbadores ou desreguladores endócrinos (DE), mais conhecidos pela sigla EDC, originada de sua denominação em inglês: “Endocrine Disrupting Chemicals”.

Os EDCs são substâncias ou moléculas químicas capazes de alterar uma função endócrina e com ela o seu equilíbrio hormonal, originando efeitos adversos sobre a saúde humana e animal.

A exposição ambiental aos desreguladores endócrinos pode ocorrer por contato direto ou indireto através da ingestão de água ou alimentos contaminados ou ainda, pelo contato com ar ou solo.

Para os seres humanos, uma das principais formas de exposição aos desreguladores endócrinos é através do consumo de alimentos. Estima-se que mais de 90% dessas substâncias ambientais sejam absorvidas por via digestiva, principalmente através de alimentos de origem animal e vegetal.

No ambiente aquático, essas substâncias são encontradas nas águas superficiais e de subsolo, sedimentos marinhos, solo, água potável e em esgotos domésticos. E, embora sejam detectadas em concentrações muito baixas (ng.L^{-1}), a presença delas é motivo de preocupação devido aos efeitos interferentes sobre a reprodução humana e de uma ampla variedade de espécies aquáticas.

Entre as substâncias que podem afetar o funcionamento do sistema endócrino, destacam-se, os hormônios naturais presentes no corpo humano e nos animais e os hormônios sintéticos utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos na alimentação animal. Continuamente excretados, através da urina e fezes por vários organismos, têm nos esgotos domésticos a sua principal forma de entrada nos ecossistemas aquáticos.

Este trabalho propõe-se a investigar a mobilidade destes contaminantes dentro das condições ambientais estabelecidas num processo de irrigação de cultura de milho por efluentes domésticos tratados. Espera-se que os resultados obtidos, possam não apenas qualificar o consumo de produtos agrícolas irrigados por esgotos tratados, mas também contribuir para a institucionalização e regulamentação da prática de reuso agrícola a partir de princípios técnicos, econômicos e sociais adequados e principalmente seguros, em termos de preservação ambiental e de proteção dos grupos de riscos envolvidos.

2 - RELEVÂNCIA DO TEMA

O uso agrícola de esgotos apresenta diversas vantagens do ponto de vista econômico, social e ambiental. Apesar disso, efeitos adversos, como o acúmulo de contaminantes químicos no solo podem estar associados ao uso de esgotos na irrigação.

A presença de poluentes químicos em uma matriz tão complexa, como os esgotos urbanos, deve ser considerada, principalmente pelo fato de que estes, uma vez adsorvidos pelas raízes e incorporados aos tecidos das plantas, não podem ser efetivamente removidos por lavagem superficial ou por cozimento.

Vários estudos confirmam a presença de fármacos tais como, antibióticos, hormônios, anestésicos, antiinflamatórios entre outros, no esgoto doméstico, em águas superficiais e de subsolo e apontam para a possibilidade dessas substâncias serem persistentes no meio ambiente e não completamente removidas nas estações de tratamento de esgotos, resistindo também, a vários processos do tratamento convencional de água (Bila e Dezotti, 2003).

O conhecimento sobre o impacto ambiental gerado pela disposição ou adsorção destes compostos é bastante restrito e embora, ainda faltem estudos que descrevam o comportamento destes compostos nos compartimentos ambientais, sabe-se que os efeitos desencadeados no ambiente atingem desde microinvertebrados até grandes vertebrados (Huang et al, 2007).

Mais recentemente, numerosos artigos têm abordado questões relativas ao aporte de compostos contaminantes bioativos no meio ambiente aquático e a conseqüente necessidade de avaliar o seu impacto potencial sobre a biota. Entre estes compostos, incluem-se os hormônios esteróides excretados por humanos e outros mamíferos e incorporados ao ambiente atra-

vés do lançamento de efluentes urbanos, com potencial para afetar adversamente o sistema reprodutivo de organismos aquáticos. Embora estes compostos sejam considerados seguros para seus propósitos médicos específicos em uso humano e veterinário, isto não é suficiente para assegurar a proteção aos ecossistemas (Ternes et al, 1999^a).

A principal preocupação com estas substâncias está relacionada à sua evidente capacidade de afetar a reprodução das espécies e interferir no seu desenvolvimento, uma vez que o lançamento de substâncias hormonalmente ativas em corpos hídricos, mesmo em baixas concentrações, pode acarretar sérios impactos sobre a dinâmica e estrutura das populações aquáticas.

Para evitar que a aplicação de efluentes contamine produtos e consumidores de produtos agrícolas podem ser adotados critérios básicos relacionados à prevenção da acumulação de poluentes no solo e de maximização da capacidade do solo em assimilar e atenuar o efeito dos poluentes. Estes critérios baseiam-se na premissa de que é possível reduzir e/ou controlar a contaminação química evitando que a acumulação de poluentes atinja níveis que afetem a saúde dos consumidores das culturas produzidas desta forma. Nesse sentido, as concentrações de poluentes no solo não poderão ultrapassar os níveis máximos toleráveis a serem estabelecidos, tornando-se imprescindível conhecer as espécies químicas presentes nos efluentes e a concentração efetivamente transferida para que as cargas máximas de aplicação ou as concentrações máximas permitidas no solo possam ser estimadas, e assim, permitir a criação de critérios científicos dos cenários de exposição que possam levar ao estabelecimento de diretrizes químicas para uso agrícola de efluentes líquidos (Hespanhol, 2003).

3 - HISTÓRICO E ESTADO ATUAL DO CONHECIMENTO

A hipótese de que substâncias químicas presentes no meio ambiente possam causar uma resposta biológica nos organismos a elas expostos, não é nova. Porém, nas duas últimas décadas, observa-se crescente preocupação, por parte da comunidade científica, em relação aos possíveis efeitos danosos causados aos humanos e outros animais pela exposição a substâncias químicas presentes no meio ambiente, com potencialidade para afetar o sistema endócrino.

O primeiro alerta sobre os efeitos dos EDC foi levantado na década de 80, quando foram observadas características femininas em machos de aves coloniais da região dos Grandes Lagos (EUA-Canadá) decorrentes da exposição à DDT, um pesticida muito utilizado em todo mundo nas décadas de 50 e 60, e que ainda hoje, embora proibido, ainda é comercializado em alguns países em desenvolvimento. Anomalias semelhantes foram observadas mais tarde, na década de 90, em populações de jacarés de vários lagos da Flórida, contaminados com o mesmo agrotóxico (Bila et al, 2007).

A partir dos anos 80, vários estudos passaram a investigar a possibilidade de que efluentes de plantas de tratamento de esgotos domésticos fossem uma das principais fontes dos efeitos estrogênicos observados sobre peixes que se desenvolviam em águas a jusante do lançamento destes efluentes.

Em 1994, estudos realizados no Reino Unido confirmam a presença de efeitos estrogênicos sobre peixes desenvolvidos em águas a jusante do lançamento de efluentes de estações de tratamento de esgotos domésticos, confirmando a hipótese de que, a despeito da com-

plexa composição de efluentes urbanos, os efeitos estrogênicos observados poderiam ser atribuídos, mesmo que em concentrações muito baixas, à presença de compostos esteróides identificados em efluentes de estações localizadas em áreas urbanas (Purdom et al, 1994).

Desde então, esta questão emergiu como sendo uma das principais no campo da pesquisa ambiental moderna. Em particular, há um interesse crescente em relação aos efeitos e riscos associados à presença em águas superficiais de contaminantes químicos com atividade estrogênica e assim com capacidade de interferir no sistema endócrino, em particular nas funções endócrinas reprodutivas.

Atualmente, organizações governamentais e não governamentais, como União Europeia (EU), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), Organização Mundial da Saúde (OMS), Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (ODCE), investigam a questão dos desreguladores endócrinos. Alguns dos estudos desenvolvidos por estas organizações são citados abaixo:

- Seminário para avaliar os riscos à saúde e efeitos ambientais dos desreguladores endócrinos – US EPA – 1995
- Seminário para desenvolvimento de estratégia para avaliar o risco dos desreguladores endócrinos ao meio ambiente – US EPA – 1996
- Revisão e discussão das informações científicas disponíveis sobre os desreguladores endócrinos – US EPA – 1998
- Primeiro relatório sobre o progresso dos trabalhos da comunidade europeia sobre os desreguladores endócrinos – Comissão das Comunidades Europeias – 2001
- Avaliação global do estado da arte da ciência dos desreguladores endócrinos – OMS – 2002
- Segundo relatório sobre o progresso dos trabalhos da comunidade europeia sobre os desreguladores endócrinos – Comissão das Comunidades Europeias – 2004

Como resultado de alguns desses estudos, destaca-se o estabelecimento pela Comissão das Comunidades Europeias de uma lista prioritária de substâncias para uma futura avaliação do seu papel na desregulação endócrina. Assim, em 2000 foi proposta uma lista com 553

substâncias sintéticas e 9 hormônios naturais e sintéticos. Dessas 553 substâncias, existem evidências de desregulação endócrina ou potencial de desregulação endócrina para 118 substâncias, para as outras 435 substâncias, os dados apresentados ainda são insuficientes para evidenciar o potencial de desregulação endócrina. Baseado nisso, dois novos estudos foram iniciados; no primeiro foram avaliados 9 substâncias sintéticas e 3 estrogênios das 118 substâncias apresentadas no relatório de 2000, que não tinham seus usos restringidos pela União Européia. O segundo estudo abrange as 435 substâncias para as quais os dados foram insuficientes no relatório de 2000. Esta última lista foi dividida em três grupos de substâncias que dependem do volume de produção, da persistência no meio ambiente, das provas de desregulação endócrina encontradas em bibliografias científicas e nas considerações relativas à exposição (Anexo I – CEC, 2004)

4 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é identificar a ocorrência de hormônios sexuais estrógenos em grãos de milho produzidos por processo de irrigação com esgotos domésticos tratados. Pretende-se que os resultados obtidos possam substanciar futuras avaliações dos potenciais riscos de contaminação associados ao consumo de culturas irrigadas por efluentes urbanos ou por mananciais poluídos.

Para atingir o objetivo proposto, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- Determinação das condições cromatográficas operacionais adequadas ao equipamento disponível para detecção e quantificação dos hormônios estrógenos naturais: estrona (E1); 17β -estradiol (E2) e estriol (E3) e para o hormônio sintético: 17α -etinilestradiol (EE2).
- Avaliação da precisão do procedimento analítico de extração adotado através de testes de recuperação dos analitos de interesse
- Determinação da concentração dos hormônios estrona (E1); 17β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17α -etinilestradiol (EE2) no afluente bruto e nos efluentes líquidos tratados.
- Determinação da concentração dos hormônios estrona (E1); 17β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17α -etinilestradiol (EE2) nos grãos de milho produzidos por fertirrigação com os efluentes tratados.

5 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 - Os Diferentes Usos das Águas Residuárias

A água é um recurso cada vez mais escasso, seja pelo crescimento populacional e inevitável aumento de demanda, seja pela redução da oferta, especialmente pela poluição dos mananciais. Em função dessa desarmonia que atinge diferentes regiões do planeta surge como alternativa potencial de racionalização, a utilização de águas residuárias para vários usos, inclusive para irrigação. São vários os benefícios agregados na prática de reuso na irrigação, incluindo a recarga do lençol freático e a fertirrigação de diversas culturas.

Assim, como em todo o mundo, cresce no Brasil a consciência em torno da importância do uso racional da água, da necessidade de controle de perdas e desperdícios e da introdução definitiva da reciclagem da água na agenda nacional. No entanto, pouco ou quase nada se tem registrado sobre a utilização direta de efluentes, tratados ou não, o que não significa que não ocorra de forma indiscriminada e sem controle. Diversos exemplos de utilização espontânea de esgotos na forma bruta ou tratada já foram observados no nordeste brasileiro, incluindo o plantio de milho, melancia, abóbora e capim para alimentação animal. Cabe ressaltar, que o Brasil oferece condições excepcionalmente favoráveis para a utilização de esgotos na agricultura, tanto pela disponibilidade de áreas em sua grande extensão territorial como pelas condições climáticas adequadas. (Mancuso, 2003)

Embora, as primeiras experiências de reuso de água tivessem por objetivo inicial o tratamento dos esgotos, a irrigação, como meio de reciclagem de água e produção agrícola constitui uma prática já centenária. As fazendas de esgotos, como ficaram conhecidas as primeiras

experiências na Inglaterra que rapidamente se disseminaram pela Europa e Estados Unidos datam do início do século XIX. Também, nos arquivos históricos da Grécia Antiga foram encontrados registros de práticas de disposição de esgotos e sua utilização na irrigação. Porém, com o crescimento e valorização das áreas peri-urbanas das cidades e o interesse pelo desenvolvimento de alternativas tecnológicas mais sofisticadas, a opção pela disposição no solo como método de tratamento foi praticamente abandonada por volta do final da primeira metade do século XX.

Atualmente, a competição por recursos hídricos limitados, acentuada em função da demanda crescente por água e crescente deterioração dos mananciais de água tem feito do reuso planejado da água um tema de grande importância, favorecendo o desenvolvimento de estudos e procedimentos que visem sua maior reutilização na agricultura em resposta ao elevado custo dos insumos agropecuários.

A prática do reuso de água pode ser considerada em diferentes modalidades, incluindo usos agrícolas, industriais e recreativos, uso urbano para fins não potáveis, recarga de aquíferos e aquíicultura. Essas modalidades não são exclusivas, podendo mais de uma delas ser empregada simultaneamente em um mesmo município ou região, embora o setor agrícola, responsável por quase 70% do consumo total de água no Brasil, deva ser considerado como prioritário em termos de reuso de água. (Hespanhol, 2003)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a utilização da água residuária pode ocorrer de forma direta ou indireta, decorrentes de ações planejadas ou não planejadas. Sob este contexto, a fertirrigação é considerada como uma atividade de reuso direto planejado que ocorre quando os efluentes, depois de tratados, são encaminhados diretamente de seu ponto de descarga até o local do reuso, não sendo descarregados no meio ambiente. Assim, a irrigação de plantas com efluente de esgoto tratado, ou fertirrigação, tem sido considerada como uma alternativa ao tratamento de efluentes no solo, principalmente em regiões secas.

5.1.1 - Utilização de esgotos tratados em irrigação

Os esgotos tratados têm um papel fundamental no planejamento e na gestão sustentável dos recursos hídricos como um substituto para o uso de águas destinadas a fins agrícolas e

de irrigação, entre outros. Entre as vantagens de reutilização de águas residuárias, de uma maneira geral e das domésticas em particular podem ser citadas: uso sustentável dos recursos hídricos, minimização da poluição hídrica nos mananciais, estímulo ao uso racional de águas de boa qualidade, diminuição de tendência de erosão do solo e conseqüente controle de desertificação por meio da irrigação e fertilização de cinturões verdes, economia de dispêndios com fertilizantes e matéria orgânica, aumento da produtividade agrícola, aumento da produção de alimentos e finalmente possibilidade de maximização da infra-estrutura de abastecimento de água e tratamento de esgoto pela utilização múltipla da água aduzida (Hespanhol, 2003).

Outro claro atrativo da reutilização de esgotos sanitários é a disponibilidade de água. Considerando a contribuição per capita de esgotos de 150 - 200 L.dia⁻¹ e a demanda genérica de água para irrigação de 1,0 a 2,0 m³.m⁻².ano⁻¹, constata-se que o volume de água residuária produzida por pessoa seria suficiente para irrigar áreas de 30 a 70 m², ou seja, uma população de 10.000 habitantes produziria água para irrigar cerca de 50 hectares. (Mancuso, 2003)

A irrigação com esgotos sanitários é praticada tanto em países industrializados quanto nos países em desenvolvimento, em extensões de área irrigada que podem chegar até a 1.330.000 ha como ocorre na China. Em vários países a prática é regulamentada por legislação específica e faz parte de programas governamentais de irrigação e gestão de recursos hídricos. Israel, Tunísia, México e EUA são exemplos de países com grande tradição no reuso de águas para produção agrícola. Na América Latina, o Peru e o Chile apresentam os principais exemplos. (Mancuso, 2003).

No Brasil, o uso da fertirrigação é relativamente recente e teve início com a aplicação de produtos orgânicos (vinhaça) em cana-de-açúcar, produzida no estado de São Paulo. Sua introdução e expansão no país data dos anos 70 e 80, com a instalação dos primeiros sistemas de irrigação por gotejamento. A partir daí, as áreas beneficiadas com a prática da fertirrigação têm crescido, principalmente nas regiões e nos pólos produtores de frutas e hortaliças. (Hespanhol, 2003)

O efluente de esgoto tratado caracteriza-se por ser um material líquido constituído por matéria orgânica, macro e micronutrientes, metais essenciais e não essenciais às plantas, orgânicos traços e patógenos. Dependendo de sua origem os esgotos podem também conter agentes químicos, alguns de toxicidade relevante e outros de padrão de ocorrência e significado

à saúde ainda pouco conhecidos (os chamados químicos emergentes, tais como os desreguladores endócrinos e os resíduos farmacêuticos).

O modo mais fácil, porém não sustentável, de descarte desse tipo de material consiste na sua disposição direta nos cursos d' água e, embora isto represente um problema ambiental, do ponto de vista agrônômico este efluente apresenta características desejáveis, pois é rico em nutrientes e, sobretudo, apresenta potencialidade de uso como fonte d' água às plantas.

A disposição de efluente no solo aproveita a capacidade filtrante da matriz do solo para reter nutrientes, poluentes e patógenos e consiste no fornecimento de água e nutrientes ao sistema solo-planta, os quais poderão ser utilizados pelas plantas para produção de matéria seca. Quando os efluentes são aplicados de forma controlada na superfície do solo, os mesmos podem adquirir um maior grau de tratamento através dos processos físicos, químicos e biológicos da matriz solo-planta-água. O solo, sendo um sistema vivo e dinâmico caracterizado por ter uma grande superfície ativa e resultante de processos físicos, químicos e biológicos reage fortemente com os constituintes do efluente. Assim, o solo e as plantas atuam como verdadeiros “filtros vivos”, absorvendo e retendo poluentes e organismos patogênicos presentes nos resíduos e efluentes. (Hespanhol, 2003)

5.2 - Os Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente

Até o final da década de 90, o foco da investigação sobre poluentes orgânicos estava direcionado quase que exclusivamente para os poluentes prioritários convencionais, com características tóxicas e carcinogênicas, tais como os defensivos agrícolas, compostos derivados de petróleo e subprodutos de processos industriais.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos métodos analíticos permitiram a identificação e avaliação dos efeitos biológicos em matrizes ambientais de outros compostos orgânicos, denominados como contaminantes emergentes, cujo estudo se encontra entre as linhas de investigação prioritárias dos principais organismos associados à proteção da saúde pública e meio ambiente. (Bila e Dezotti, 2007)

Dentro desta nova classe de poluentes orgânicos, um grupo específico de compostos desperta grande interesse pelo fato de ser apontado como responsável por interferências no sistema endócrino de organismos humanos e animais.

O sistema endócrino é um mecanismo complexo constituído por combinações de glândulas e hormônios, que coordena e regula a comunicação entre as células, sendo responsável pelas funções biológicas normais, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo. (Reis Filho, 2007)

Tais compostos que podem ser de origem antrópica (xenoestrogênicos) ou de origem natural (fitoestrogênicos), são mundialmente denominadas “endocrine disruptors” (EDs) ou ainda “endocrine disrupting compounds or chemicals” (EDCs).

A tradução para a língua portuguesa tem gerado algumas denominações diferentes, como: “perturbadores endócrinos”, “disruptivos ou disruptores endócrinos”, “desreguladores endócrinos”, “interferentes endócrinos”, “estrogênicos ambientais” dentre outras. (Bila et al, 2003; Silva et al, 2005; Ghiselli e Jardim, 2005; Ghiselli e Jardim, 2007).

Muitas definições têm sido propostas para um desregulador endócrino. Entretanto, em todas existe um ponto em comum: trata-se de uma substância química que pode interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos. (Bila e Dezotti, 2007)

Em maio de 1997, a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (“U.S. Environmental Protection Agency – USEPA”) através de seu comitê consultivo, responsável pela avaliação e diagnóstico de interferentes endócrinos: “Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee – EDSTAC” propôs uma definição mais detalhada que considerava a ampla diversidade de mecanismos envolvidos nas disfunções do sistema endócrino. O EDSTAC descreve um interferente endócrino como sendo uma substância ou mistura química exógena que altera uma ou mais funções do sistema endócrino, bem como a sua estrutura, causando efeitos adversos tanto sobre um organismo e sua descendência, como em populações ou subpopulações de organismos, tendo como base estudos científicos, dados, evidências de peso e princípios de precaução (Ghiselli e Jardim, 2007)

O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) em conjunto com o Japão, os EUA, o Canadá e a União Européia define um desregulador endócrino como uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações”. (Bila e Dezotti, 2007)

Cabe ressaltar, que o Conselho Americano de Ciência e Saúde se contrapõe ao uso do termo “disruptor endócrino”, argumentando que o mesmo sugere que os efeitos de tais substâncias sejam negativos, embora seja concebível que a exposição a essas substâncias possam conduzir a resultados benéficos

A exposição aos desreguladores endócrinos pode ocorrer através do contato direto no local de trabalho ou em casa, ou indireto através da ingestão de água, ar ou alimentos e ao contato com o solo.

Para os seres humanos a mais importante fonte de contaminação é a alimentação, uma vez que muitas destas substâncias são utilizadas durante a produção de alimentos e/ou no processo de embalagem dos mesmos, ou ainda através da ingestão de água potável contaminada, pois várias destas substâncias não são totalmente destruídas ou degradadas durante o processo empregado nas estações de tratamento, tanto de água como de esgoto. (Birkett e Lester, 2003; Ghiselli e Jardim, 2007)

Além disto, alguns desreguladores endócrinos são solúveis em gorduras, assim, altos níveis podem estar presentes em alimentos de origem animal como carne, peixe, ovos e derivados do leite. Vários estudos realizados em países europeus relataram a ocorrência de hormônios sexuais (17 β -estradiol, estrona, testosterona e progesterona) em carnes (gado, porco, aves e peixes), leite e seus derivados, ovos e plantas (gramíneas e leguminosas). (Hartmann et al,1998).

A exposição aos desreguladores endócrinos pode ser responsável por alterações fisiológicas e histológicas em animais silvestres e de laboratório, feminização de peixes machos, indução ao hermafroditismo, inibição no desenvolvimento das gônadas e declínio na reprodução. Também, efeitos como diminuição na eclosão de ovos de pássaros e tartarugas; problemas no sistema reprodutivo de peixes, répteis, pássaros e mamíferos têm sido associados à exposição destas espécies animais aos desreguladores endócrinos. (Bila e Dezotti, 2007)

Em seres humanos, esses efeitos estão relacionados a alterações no sistema endócrino, incluindo efeitos no sistema reprodutivo feminino (diferenciação sexual, disfunção dos ovários, aumento no risco de câncer de mama e de vagina, ovários policísticos e endometriose) e no sistema reprodutivo masculino (declínio das taxas de espermatozóides, aumento no risco de câncer testicular e de próstata, deformidade dos órgãos reprodutivos e alterações nos níveis hormonais da tireóide).

5.2.1 - Os desreguladores endócrinos e a legislação brasileira

As legislações brasileiras não contemplam normas específicas relativas ao monitoramento de substâncias desreguladoras endócrinas em corpos hídricos, devendo ser consideradas, basicamente, as normas que tratam da classificação dos corpos d' água em função dos usos preponderantes – Resolução CONAMA n° 357/2005 e de padrões de qualidade da água para consumo humano – Portaria MS n° 518/2004.

Na relação de variáveis de qualidade contempladas na Resolução CONAMA é encontrada uma grande variedade de substâncias e compostos químicos, orgânicos e inorgânicos, algas e microrganismos, além de propriedades físicas da água. No grupo de variáveis químicas são abordados 54 substâncias e compostos, principalmente agroquímicos e solventes orgânicos, alguns dos quais com potencial de interferência no sistema endócrino, embora não sejam contemplados substâncias e compostos químicos que na atualidade encontram-se na categoria de desreguladores endócrinos, como por exemplo, hormônios naturais e sintéticos.

No entanto, a Resolução CONAMA abre precedentes para incluir na relação de variáveis de qualidade da água qualquer substância que possa comprometer o uso da água para os fins previstos, dependendo das condições específicas locais ou, então, mediante fundamentação técnica.

No caso da Portaria 518 que estabelece os padrões de qualidade da água para abastecimento público são definidos os padrões de qualidade para a água potável, considerando-se os riscos associados à presença de microrganismos e substâncias químicas. Nesta portaria estão contempladas substâncias inorgânicas e orgânicas, especificamente os agrotóxicos, sendo que os limites de qualidade foram baseados nas diretrizes definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). De maneira similar ao que ocorre na Resolução CONAMA, também não são definidos limites de qualidade para as substâncias atualmente enquadradas com base no seu potencial estrogênico, mas sim de toxicidade.

Com base nas premissas existentes nas duas principais normas que tratam da qualidade da água no território nacional e a partir de estudos desenvolvidos em vários países sobre os efeitos dos desreguladores endócrinos em organismos aquáticos e efeitos potenciais na saúde humana, além do monitoramento destas substâncias nos corpos hídricos em algumas regiões

específicas do país, é possível prever que, no futuro, tais substâncias poderão vir a ser contempladas nas legislações existentes ou, então, em normas específicas. (Bila e Dezotti, 2007)

5.2.2 - Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos

Com base em informações disponíveis na literatura, foram elaboradas por várias organizações mundiais, listas de substâncias químicas suspeitas de causar desregulação do sistema endócrino. Contudo, ainda se faz necessário uma investigação científica mais profunda a fim de se identificar os critérios de seleção utilizados para agrupar as substâncias nestas listas. (CEC, 2004).

A Comissão da Comunidade Européia propôs em 2000, uma lista prioritária de 553 substâncias sintéticas e 9 hormônios naturais e sintéticos que deveriam ser avaliadas em relação ao seu papel na desregulação endócrina. Dessas, existem evidências de desregulação endócrina ou potencial de desregulação para 118 substâncias, sendo 12 destas designadas como prioritárias para a condução de estudos mais detalhados. São elas: dissulfeto de carbono, ortofenilfenol, difenil éter tetrabromado, 4-cloro-3metifenol, 2,4-diclorofenol, resorcinol, 4-nitrotolueno, 4-octifenol, estrona, estradiol, etinilestradiol e 2,2-bis(4-(2,3-epoxipropoxil)fenil)propano. (Anexo 1-CEC, 2004; Birkett e Lester, 2003)

As substâncias classificadas como EDC, incluindo substâncias naturais e sintéticas podem ser agrupadas em duas classes: 1. Substâncias sintéticas utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, bifenil policlorados (PCB), alquilfenóis, ftalatos, bisfenol A, metais pesados, entre outros; compostos terapêuticos e farmacêuticos, como os estrogênios sintéticos e, 2. Substâncias naturais – fitoestrogênios, tais como, genisteína e metarestinol e estrogênios naturais como 17β -estradiol, estrona e estriol. (Bila e Dezotti, 2007)

Freqüentemente encontrados em efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETE) e águas naturais em concentrações suficientes para provocar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, estes compostos, amplamente utilizados pela sociedade moderna, incluem desde produtos químicos industriais como inseticidas, hidrocarbonetos aromáticos, antioxidantes, plasticidas até compostos farmacêuticos (fármacos) como antibióticos de uso veterinário e humano, anticoagulantes, antidepressivos, analgésicos, anestésicos, antiinflamatórios,

anti-hipertensivos e esteróides hormonais de natureza estrogênica e androgênica. (Bila e Dezotti, 2003; Filho et al, 2007)

Os fármacos, de uma maneira geral, são classificados como contaminantes ambientais emergentes devido as suas propriedades biologicamente ativas. Além disso, a grande maioria deles possui características lipofílicas e freqüentemente apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente, o que lhes confere um grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente. Estudos ecotoxicológicos demonstram que a presença de fármacos residuais na água pode causar efeitos adversos na saúde, seja humana ou de outros organismos aquáticos e que estes efeitos podem ser detectados em qualquer nível de hierarquia biológica: célula, órgãos, organismos, populações e ecossistemas. (Filho et al, 2007)

Entre os fármacos de maior toxicidade encontram-se os hormônios esteróides ou hormônios sexuais. Hormônios são substâncias químicas produzidas e secretadas pelas glândulas endócrinas e que, lançadas na corrente sanguínea, coordenam o funcionamento do organismo como um todo. Usados em grandes quantidades na medicina humana e veterinária (crescimento do gado, na aquicultura e produção avícola e suína) são capazes de induzir alterações no sistema reprodutor e hormonal em concentrações menores que aquelas encontradas comumente no ambiente. (Birkett e Lester al, 2003; Lintelmann et al, 2003)

As evidências mostram que os sistemas reprodutivos de certos organismos terrestres e aquáticos são afetados por hormônios esteróides, resultando no desenvolvimento de anormalidades e deterioração reprodutiva nos organismos expostos. Alguns autores relatam que, dependendo da dose e do tempo de exposição, é possível que essas substâncias estejam relacionadas com doenças como câncer de mama, câncer testicular e de próstata, desenvolvimento de ovários policísticos e redução da fertilidade masculina. (Alda e Barceló, 2001^a; Filho et al, 2006; Bila e Dezotti, 2007)

5.3 - Hormônios Esteróides de Interesse Ambiental

Os esteróides compreendem uma grande variedade de compostos orgânicos naturais e sintéticos, incluindo ácidos biliares, corticosteróides e hormônios também chamados de hormônios sexuais. Estes últimos são grupos de compostos biologicamente ativos, sintetizados a partir do colesterol e classificados em três grupos principais: **hormônios sexuais femininos**

ou estrógenos (estrogênios); hormônios sexuais masculinos ou andrógenos (androgênios) e hormônios da gravidez ou progestógenos.

Dentre estes, os estrógenos vêm recebendo maior atenção por estarem relacionados à etiologia de vários tipos de cânceres, embora os hormônios masculinos também possam afetar o sistema endócrino. Os estrógenos influenciam o crescimento, o desenvolvimento e a funcionalidade de tecidos periféricos dos sistemas reprodutivos de machos e fêmeas. Sabe-se também que, os estrógenos têm um importante papel sobre o sistema cardiovascular e no sistema nervoso central. Frequentemente são referidos como estrogênios ambientais, estrogênios exógenos ou exoestrogênios. (Bila e Dezotti, 2003)

Como são os principais responsáveis pelo crescimento e pela reprodução de espécies animais, incluindo os seres humanos, seus derivados sintéticos são bastante empregados como contraceptivos e no controle dos sintomas que envolvem a menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de mama e de próstata. Em geral, são rapidamente absorvidos pelo organismo e, então, metabolizados no fígado. (Alda et al, 2003; Birkett e Lester, 2003;)

Devido à sua estrutura básica os estrógenos são quimicamente referenciados como esteróides C₁₈, contendo 18 átomos de carbono distribuídos em três anéis hexagonais (A,B e C) e um anel pentagonal (D). São lipofílicos e apenas levemente solúveis em água. Quando dissolvidos, podem ser rapidamente removidos da fase aquosa como resultado da ligação a sólidos suspensos. (Nozaki, 2001).

Os estrógenos naturais como o 17 β -estradiol (E2), o estriol (E3) e a estrona (E1) e o sintético como o 17 α -etinilestradiol (EE2), desenvolvido para uso médico em terapias de reposição e métodos contraceptivos, são os que despertam as maiores preocupações ambientais, tanto pela potência estrogênica como pela quantidade contínua introduzida no ambiente. (Filho et al, 2006).

A Figura 1 apresenta as estruturas químicas destes compostos.

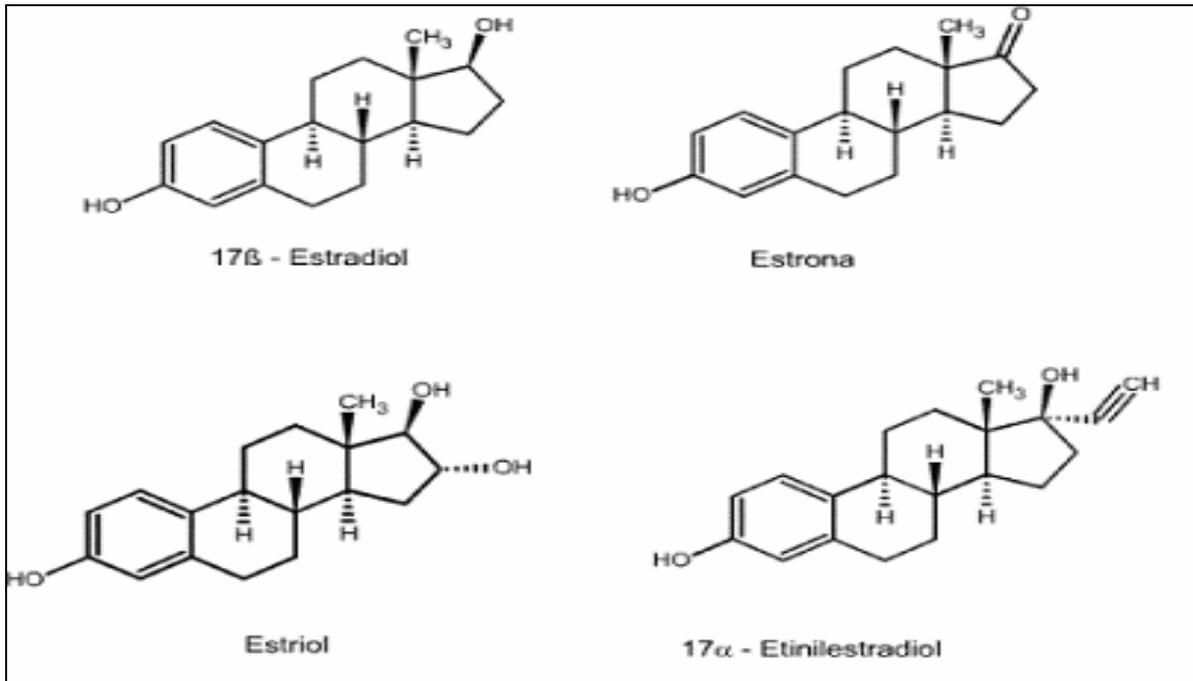


Figura 1 – Estrutura química dos hormônios estrógenos

O destino e o comportamento destes compostos, tanto no organismo como no meio ambiente, estão diretamente relacionadas com suas propriedades físico-químicas. Portanto, para que se possam compreender os efeitos destas substâncias no meio ambiente, suas propriedades físico-químicas como: solubilidade em água, coeficiente de partição, hidrofobicidade, biomagnificação, coeficiente de partição e toxicidade necessariamente devem ser consideradas.

A tabela 1 apresenta algumas propriedades dos esteróides estrógenos considerados acima.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas e toxicidade de estrógenos (Ghiselli e Jardim, 2007)

Hormônio	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Solubilidade (mg/L) em H ₂ O	Pressão de vapor (mm Hg)	Log K _{OW} ^a	LD ₅₀ ^b (mg/Kg)
estrona (E1)	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,4	13	2,3.10 ⁻¹⁰	3,43	-
17β-estradiol (E2)	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	13	2,3.10 ⁻¹⁰	3,94	-
estriol E3	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,4	13	6,7.10 ⁻¹⁵	2,81	-
17α-etinilestradiol (EE2)	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4	4,8	4,5.10 ⁻¹¹	4,15	1737

(a) Coeficiente de partição octanol-água

(b) Dose letal para 50% das espécies estudadas (ratos ou camundongos), por via oral

Observa-se na tabela 1 que os estrógenos são compostos orgânicos hidrofóbicos de baixa volatilidade, desta forma, é de se esperar que a sorção no solo ou sedimentos seja um fator significativo de redução das concentrações dessas substâncias em fase aquosa. (Ghiselli e Jardim, 2007).

Essas propriedades também ajudam a explicar porque estradiol (E2) e etinilestradiol (EE2), que apresentam valores de coeficientes de partição relativamente altos, são menos frequentemente encontrados em águas que a estrona (E1), ou porque o hormônio sintético (EE2) mostra maior tendência à partição em sedimentos que os hormônios naturais. (Lai et al, 2000; Kuster et al, 2007)

5.3.1 - Principais meios de exposição e destino ambiental

A aplicação terapêutica é uma das principais formas de exposição humana e veterinária a hormônios esteróides. Estrógenos sintéticos usados como contraceptivos, na prevenção de aborto, no tratamento de câncer, em tratamentos de reposição hormonal, osteoporose e outros são a segunda droga mais prescrita nos EUA.

Em 1987, o jornal da Associação Médica Americana (JAMA) já mencionava a prescrição de estrógenos para cerca de 200 tratamentos terapêuticos. Atualmente, estima-se que mais de 620 milhões de mulheres ao redor do mundo fazem uso de métodos contraceptivos, estando as pílulas anticoncepcionais (EE2) entre os medicamentos mais utilizados, com doses orais diárias variando entre 30 a 50 µg por pessoa. Considerando que, cerca de 40% a 60% das doses ministradas de estrógenos sintéticos podem ser disponibilizadas para o ambiente, as altas taxas de uso conferem um caráter de persistência ambiental para hormônios sexuais introduzidos no ambiente. (Filho et al, 2006).

No Brasil existem aproximadamente oito milhões de usuárias de pílulas anticoncepcionais, havendo a perspectiva de que esse número possa chegar a 45 milhões nas próximas duas décadas, de acordo com projeções realizadas em 2006 pelo setor industrial farmacêutico brasileiro. (Fernandes e Bresaola, 2010)

Os organismos excretam diferentes quantidades de esteróides sexuais, dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou gravidez. A quantidade de estrogênio excretada por uma mulher grávida pode ser até mil vezes superior a de uma mulher em atividade normal (da ordem de 2 a 20 µg/L de estrona/dia, 3 a 65 µg/L de estriol/dia e 0.3 a 5,0 µg/L estradiol/dia) dependendo do estágio da gravidez. (Ying et al, 2002; Ghiselli e Jardim, 2007).

A tabela 2 reproduz uma estimativa das quantidades diárias de hormônios excretadas por humanos, obtida através de simulações feitas pelos serviços de saúde do Reino Unido (Ying et al, 2002).

Tabela 2 - Excreção diária ($\mu\text{g}/\text{dia}$) per capita de estrogênios por humanos.

(Ying et al, 2002)

Estrógeno	Homens	Ciclo mens-trual	Gravidez	Menopausa	Mulheres
Estrona: E1	3,9	8,0	600	4,0	-
Estradiol: E2	1,6	3,5	259	2,3	-
Estriol: E3	1,5	4,8	6000	1,0	-
Etinilestradiol: EE2	-				35

Após ingestão e metabolização, os estrogênios excretados através da urina e fezes por mulheres, animais fêmeas e em menor quantidade por homens seguem para a rede coletora, adentrando depois ao ambiente. Desta forma, o lançamento de efluentes *in natura* ou mesmo tratados são as principais vias de contaminação do ambiente aquático, seja pelo déficit de infra-estrutura em saneamento, seja pela ineficiência (tecnológica e/ou operacional) das estações de tratamento. O modo de entrada destes contaminantes nos ecossistemas está exemplificado na Figura 2. (Filho et al, 2006).

A concentração de hormônios excretada pela população humana no meio ambiente dependerá não só da quantidade e diversidade desta população e dos compostos ingeridos, mas também da extensão das transformações destes compostos no corpo humano e, embora esteróides conjugados não possuam uma atividade biológica direta, eles podem agir como reservatórios precursores capazes de serem reconvertidos a esteróides livres por bactérias no meio ambiente. (Desbrow et all, 1998; Jonhson e Williams, 2004)

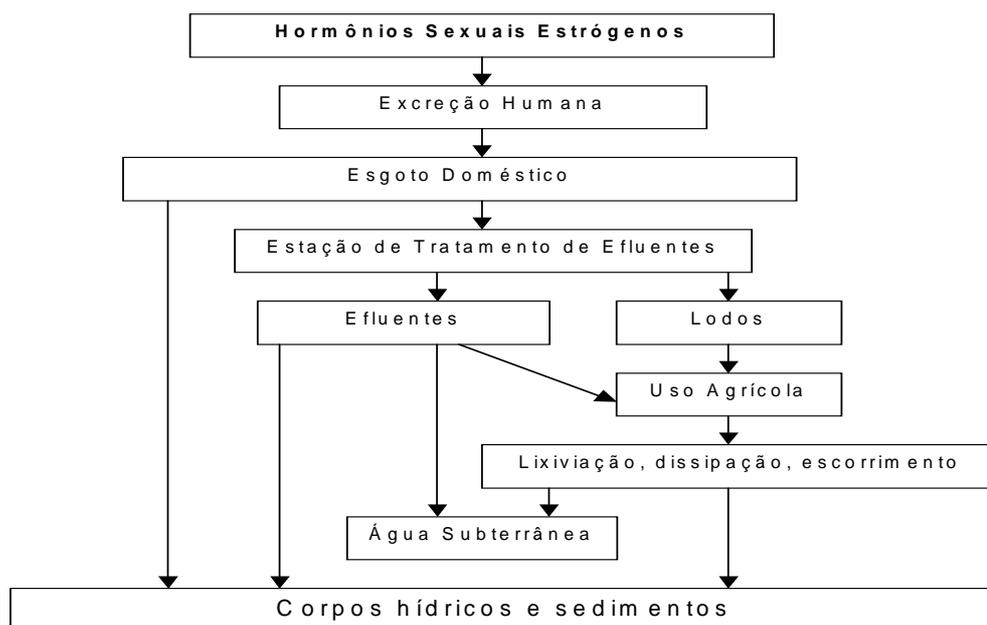


Figura 2 – Representação esquemática do modo de contaminação dos ecossistemas aquáticos por hormônios sexuais

Fonte: Filho et al, 2006

O destino destes compostos no ambiente depende de suas características físicas e químicas e das propriedades do meio receptor. As inúmeras variáveis que atuam em conjunto no ambiente aquático, como temperatura, turbidez, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido, radiação, matéria orgânica e concentração de diversas outras substâncias, tornam a tarefa de modelar o comportamento destes compostos bastante complexa. (Filho et al, 2006).

A água potável é outra significativa fonte de exposição. As águas superficiais e de subsolo, principalmente fontes de água potável, podem ser contaminadas pela infiltração de substâncias químicas através do solo, na agricultura ou mesmo em áreas urbanas, ou no descarte de efluente industrial e doméstico, sendo que muitas dessas substâncias não são removidas pelos processos convencionais de tratamento de água (Bila e Dezotti, 2007)

Em águas subterrâneas, a ocorrência de hormônios é observada, principalmente em áreas com alta densidade de criação de animais, em decorrência da administração destas subs-

tâncias como promotores de crescimento ou como resultado natural da excreção animal. (Peterson et al, 2001)

Outras formas de disposição observadas são devidas ao uso do lodo digerido proveniente das ETEs na agricultura e da disposição de resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários, contaminando as águas de subsolo nas cercanias do aterro. (Bila e Dezotti, 2003)

Após lançados no ambiente aquático, os estrógenos podem ser eliminados ou convertidos por diferentes mecanismos, sendo a sorção e a biodegradação os mais importantes. Devido a sua lipofilicidade e baixa volatilidade, o processo de sorção em sedimentos suspensos pode ser um fator significativo na redução dos estrógenos na fase aquosa. (Ying et al, 2002)

As substâncias estrogênicas, devido à sua baixa polaridade, tendem a se acumular em sedimentos, e assim, hormônios dissolvidos podem rapidamente se tornar adsorvidos aos sólidos em suspensão, indicando que a competição pelos sítios de ligação com outros compostos mais hidrofóbicos e a respectiva saturação destes sítios é o mecanismo responsável pela proporção de estrógenos que permanecem na fase aquosa. (Petrovic et al, 2004; Filho et al, 2006).

De acordo com Jurgens (1999), os leitos de sedimentos adsorvem entre 13% a 92% dos estrógenos lançados no meio aquático, sendo que a maior parte desta sorção ocorre nas primeiras 24 horas de contato, com os estrogênios sintéticos mostrando um maior grau de sorção que os hormônios naturais.

A meia-vida dos estrógenos varia entre horas e dias, dependendo do composto em particular e das condições ambientais, tais como intensidade de luz, temperatura, propriedades do solo e da água, sendo que os estrógenos sintéticos, em geral, são mais persistentes que os compostos naturais. A meia-vida dos hormônios naturais é de 0,2 a 9 dias em água e em torno de 0,11 a 0,4 dias em sedimentos, enquanto o EE2 tem uma meia-vida de 20 a 40 dias em água e bem superior a dos hormônios naturais em sedimentos. (Kuster et al, 2009)

Ainda, a baixa fotodecomposição e biodegradação dos estrógenos sob condições anaeróbicas, normalmente presentes em camadas sub-superficiais dos rios, fazem com que os sedimentos ajam como um depósito onde os estrógenos podem persistir por um longo período de tempo ou ser transportado para outras áreas e eventualmente, ser novamente liberado para o meio aquático. (Lai et al, 2000).

5.3.2 - Ocorrência de hormônios esteróides em alimentos

A existência de esteróides é difundida tanto no reino animal como no reino vegetal, mas enquanto a ocorrência de hormônios esteróides em alimentos de origem animal tem sido freqüentemente registrada por trabalhos científicos, a presença destes compostos, especialmente de estrogênios, em vegetais é controversa e vem sendo discutida a mais de cinquenta anos.

Segundo Hartmann (1998), precursores de hormônios esteróides têm sido inequivocamente isolados em plantas superiores como em trigo, arroz, aveia, feijão e em palmitos.

Sabe-se que as plantas podem possuir atividade hormonal promovendo efeitos visíveis sobre o crescimento animal. As isoflavonas, presentes em plantas na ordem de mg.kg^{-1} a g.kg^{-1} , são as principais responsáveis por esta atividade estrogênica.

O interesse público sempre focou os resíduos de hormônios em carnes, principalmente de gado ou vitela. Porém, hormônios esteróides também são constituintes naturais de tecidos gordurosos e musculares, como fígado, rim, ossos e cérebro. A ocorrência destes compostos não está restrita a mamíferos, tendo também sido determinados em peixes e aves domésticas e em outros alimentos derivados de animais, como ovos e leite. (Fritsche e Steinhart, 1999)

Em contraste à preocupação dos consumidores, os cientistas consideram a ocorrência e uso de hormônios naturais como segura, principalmente porque as dosagens hormonais aplicadas em animais raramente excedem os níveis fisiológicos encontrados em animais não tratados com hormônios. (Hartmann et al, 1998)

Até agora, quase que exclusivamente, produtos alimentícios de origem animal foram considerados para estimar a exposição humana a esteróides estrógenos. Estudos conduzidos por Hartmann (1998) avaliando a contribuição diária de hormônios baseado na ingestão de uma dieta alimentar germânica indicam que a principal fonte de estrogênios na dieta alimentar são os produtos lácteos (60-80%) e que ovos e vegetais contribuem na mesma ordem de grandeza dos hormônios encontrados nas carnes, em torno de 10%. Os resultados desse estudo ainda apontaram que a produção hormonal humana calculada entre 50 a 60 $\mu\text{g.d}^{-1}$ excede em muitas ordens de grandeza o consumo diário de aproximadamente 0,1 μg de estrógenos naturais, permitindo concluir que nenhum efeito hormonal, e conseqüentemente nenhum efeito promotor de tumores, pode ser esperado da ocorrência natural de esteróides em alimentos.

A tabela 3 apresenta uma estimativa do consumo diário de hormônios esteróides baseado nas tabelas nutricionais de uma dieta alemã.

Tabela 3 - Estimativa do consumo diário de hormônios esteróides através de dieta alimentar (Hartmann et al, 1998)

Estrógenos (17 β -estradiol + estrona) ($\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)				
	Peixes	Lacteos	Ovos	Vegetais
Homens	0,02	0,06	0,02	0,00
Mulheres	0,01	0,05	0,02	0,00
Rapazes	0,01	0,06	0,01	0,00
Meninas	0,01	0,05	0,01	0,00
Contribuição relativa	15-20%	60-80%	15-20%	< 10%

Estes valores excedem a produção de esteróides por humanos, como é mostrado na tabela 4. Crianças, que apresentam a menor produção hormonal, produzem cerca de 20 vezes a quantidade de progesterona e cerca de 1000 vezes a quantidade de testosterona e estrogênios em relação ao que é em média ingerido diariamente através dos alimentos.

Tabela 4 - Produção diária de hormônios estrógenos x ingestão diária (Hartman et al, 1998)

	ESTROGENOS (17 β -estradiol + estrona)	
	Produção diária ($\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)	Consumo diário ($\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)
Homens	140	0,10
Mulheres	630	0,08
Rapazes (pré-puberdade)	100	0,08
Moças (pré-puberdade)	54	0,07

5.3.3 - Efeitos sobre o meio ambiente

Os efeitos desencadeados pelos hormônios dispostos no ambiente podem atingir desde microinvertebrados até grandes vertebrados e não dependem apenas das suas concentrações, mas também de outros fatores, tais como, lipofilicidade, persistência, bioacumulação, tempo de exposição, mecanismo de biotransformação (resultando em metabólitos ou subprodutos igualmente ou até mais danosos que os compostos originais) e de excreção.

A exposição, mesmo a baixos níveis de concentração pode levar a altos níveis no corpo de animais, em função do fenômeno de biomagnificação, que resulta essencialmente de uma seqüência de etapas de bioacumulação que ocorrem ao longo da cadeia alimentar.

Bioacumulação é um termo geral que descreve a tomada de um contaminante químico, do ambiente, por uma ou todas as rotas possíveis (respiração, dieta, via dérmica, etc.), a partir de qualquer fonte no ambiente onde tais substâncias estão presentes. Por exemplo, os peixes assimilam algumas substâncias químicas procedentes de sua alimentação, ou ainda através da ingestão de material particulado adsorvido nos sedimentos ou presente em suspensão nas águas. Em muitos casos, tais substâncias não são metabolizadas pelo peixe, ou seja, acabam se acumulando nos tecidos adiposos, nos quais sua concentração aumenta com o tempo. Aves predadoras que se alimentam destes peixes, por consequência, apresentarão concentrações ainda maiores destas substâncias no organismo. Por isso, os animais que se encontram no topo da cadeia apresentam concentrações mais altas dessas substâncias no corpo que os organismos do início da cadeia alimentar. (Birkett e Lester, 2003)

Inúmeros são os efeitos desencadeados especificamente pelos hormônios sexuais sobre a biota: alterações nas taxas de fecundidade, fertilização, eclosão, modificações comportamentais (agressividade, movimentação), histopatologias (fígado, gônadas, rins), imunodepressão, imposex (desenvolvimento de características sexuais femininas em machos ou oposto) e inibição do desenvolvimento dos órgãos sexuais. (Ghiseli e Jardim, 2007; Bila e Dezotti, 2007; Kuster et al,2007).

Os vários efeitos manifestam-se após interação entre agentes e receptores bioquímicos. Portanto, as respostas bioquímicas são perceptíveis antes que os efeitos sejam observados em níveis de organização superior, como em populações, comunidades e ecossistemas e conseqüentemente numerosos testes e biomarcadores têm sido desenvolvidos para detectar a atividade estrogênica dessas substâncias (Filho et al, 2006; Bila e Dezotti, 2003).

Um marcador bastante adotado na investigação da atividade estrogênica de substâncias é a determinação da proteína vitelogenina (VTG) no plasma sanguíneo de organismos aquáticos, principalmente peixes. (Folmar et al, 2000; Solé et al, 2001; Bila e Dezotti, 2007).

A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína sintetizada por todas as fêmeas de ovíparos durante o ciclo reprodutivo, é produzida no fígado e secretada na corrente sanguínea, onde é transportada até os ovários, acumulando-se nos ovócitos em crescimento para ser, então, utilizada como precursora das reservas nutricionais necessárias para o desenvolvimento subsequente dos embriões. Em indivíduos imaturos ou em machos, a codificação do gene para esta proteína não existe ou é muito fracamente expressa, possivelmente pela baixa concentração de estrogênio no sangue.

A presença desta proteína no sangue de organismos representa um biomarcador de exposição, pois sua síntese depende da presença de xenoestrógenos. Além de proporcionar uma avaliação qualitativa de exposição a agentes estrogênicos, a própria produção da VTG no gênero masculino envolve prejuízos, ainda que indiretos, para o desenvolvimento dos organismos. A sobrecarga das funções hepáticas e a disrupção metabólica, devido ao desvio na produção de proteínas essenciais em detrimento da produção de VTG, juntamente com a baixa resistência imunológica e retardo no crescimento são alguns dos possíveis danos apontados na literatura. (Filho et al, 2006; Bila e Dezotti, 2007).

5.3.3.1 - Efeitos relatados em animais silvestres e de laboratório

Vários estudos relacionam a poluição ambiental das águas naturais com anomalias no sistema reprodutivo e no desenvolvimento de espécies animais.

No estudo de Routledge (1998), duas espécies de peixes, *Oncorhynchus mykiss* e *Rutilus rutilus*, foram expostas por 21 dias a concentrações de 17 β -estradiol e estrona ambientalmente relevantes e os resultados confirmaram que os estrogênios identificados em efluentes domésticos estão presentes em quantidades suficientes para induzir a síntese de VTG nestas espécies de peixes.

Gagné apud Bila (2007) examinou o efeito da atividade estrogênica dos efluentes de uma ETE sobre mexilhões da espécie *Elliptio complanata* proveniente de águas naturais. Os mexilhões foram expostos a um efluente de ETE por aproximadamente dois meses. Os autores observaram um aumento dos níveis de VTG em mexilhões machos e fêmeas, além de anomalias no crescimento da concha dos mexilhões.

A indução da síntese de VTG não ocorre só em espécies de peixes, mas também em outras espécies de animais. Experimentos com tartarugas mostraram que concentrações ambientalmente relevantes (na faixa de 30 a 500 ng.L⁻¹) de 17 β -estradiol são suficientes para induzir a síntese de VTG nesta espécie, provocando alterações na produção de ovos. (Bila e Dezotti, 2007).

Também, espécies de jacarés jovens que viviam em lagos poluídos da Flórida, apresentaram anomalias no sistema reprodutivo, tais como, concentrações anormais de hormônios sexuais no plasma (baixa concentração de testosterona) e anomalias morfológicas nas gônadas (redução no tamanho do pênis). A causa dessas anomalias pode estar relacionada com a presença de substâncias estrogênicas e anti-andrógenas. (Guillette e Jardim, 1999, Bila e Dezotti, 2007)

Os peixes são um dos grupos de organismos mais estudados em termos de efeito de substâncias com atividade estrogênica no desenvolvimento de anomalias no sistema reprodutivo. Estudos citados por Bila e Dezotti (2003), mostram claramente que a exposição a concentrações ambientais do estrogênio 17 β -estradiol por três semanas induz a concentrações elevadas de VTG e à incidência de hermafroditismo em peixes machos da espécie *Oryzias latipes*.

No estudo de Rodrges apud Bila e Dezotti (2007) peixes jovens da espécie *Rutilus rutilus* foram expostos à concentrações gradativas de efluente de ETE por 150 dias. Os resultados mostraram que a exposição induziu a feminização de peixes machos. Subsequentemente, os peixes foram gradativamente expostos a águas naturais por mais 150 dias, resultando na

redução de VTG no plasma, porém, não se observou alteração no sistema sexual feminizado dos peixes, indicando que o desenvolvimento da anomalia no sistema reprodutivo foi permanente.

De acordo com os estudos de Panter apud Bila e Dezotti (2007), concentrações baixas de 17 β -estradiol e estrona, similares às concentrações encontradas em efluentes, causaram profundos efeitos em peixes machos da espécie *Pimephales promelas*. Os efeitos relatados foram a síntese de VTG e a inibição testicular.

No estudo de Folmar et al (2000), as menores concentrações de substâncias com atividade estrogênica que induziram a síntese de VTG em uma população de peixes machos da espécie *Cyprinodon variegatus* foram de 200 ng.L⁻¹ para o 17 β -estradiol e de 100 ng.L⁻¹ para o 17 α -etinilestradiol.

Embora as concentrações desses hormônios nos efluentes sejam baixas, estas são suficientemente elevadas para induzir a síntese de VTG em peixes machos em experimentos de laboratório como descrito nos vários estudos citados acima.

5.3.3.2 - Efeitos relatados em humanos

No que diz respeito aos efeitos na saúde humana, os esteróides podem induzir o desenvolvimento de tumores. Alguns tipos de câncer podem estar ligados à exposição inadequada e/ou prolongada a hormônios endógenos ou substâncias estrogênicas. A proliferação celular aumenta devido à indução de estrogênios, o que leva ao aumento da probabilidade de ocorrerem mutações durante a síntese de DNA. (Bila e Dezotti, 2007)

Uma fonte bastante crítica é a presença dessas substâncias químicas nos organismos das fêmeas que podem ser transferidas para os embriões, fetos ou filhotes através de ovos, placenta ou leite materno e afetar o desenvolvimento. Os hormônios desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário e fetal. Nos mamíferos alguns desreguladores endócrinos atravessam a barreira placentária afetando o desenvolvimento do feto e podem igualmente ultrapassar a barreira hemato-encefálica e exercer seus efeitos no sistema nervoso. Nos animais aquáticos, a exposição aos poluentes é inevitável, pois grande parte do seu ciclo reprodutivo ocorre fora do corpo das fêmeas, proporcionando um contato direto durante a fase gestacional. (Bila e Dezotti, 2007)

O desenvolvimento e as funções do sistema reprodutivo feminino dependem do balanço e das concentrações dos hormônios (estrogênios, andrógenos e tireoidianos), assim, uma disfunção no sistema endócrino pode resultar em algumas anomalias, tais como, irregularidades no ciclo menstrual, prejuízos na fertilidade, endometriose e ovários policísticos (Bila e Dezotti, 2007)

Sabe-se que os desreguladores endócrinos têm a capacidade de modular ou alterar a intensidade dos hormônios, no entanto, resta saber se essas substâncias podem realmente afetar as funções do sistema reprodutivo feminino. Contudo, alguns fatos demonstram que isso pode realmente ocorrer, como por exemplo, a relação de uso de dietilestilbestrol (DES) em mulheres grávidas na década de 70 com o desenvolvimento de anomalias no sistema reprodutivo feminino de meninas nascidas de mães que fizeram uso desse medicamento.

Também, durante estágios prematuros da vida, na fase fetal e no desenvolvimento jovem, os hormônios são os principais responsáveis pelo controle e desenvolvimento de alguns tecidos e órgãos, incluindo o sistema reprodutivo, imunológico e nervoso. As crianças e jovens são as espécies que apresentam os maiores riscos quando expostos aos desreguladores endócrinos, pois, durante este estágio crítico de desenvolvimento, desequilíbrios hormonais podem acarretar problemas que se manifestarão mais tarde. Como o desenvolvimento dos sistemas reprodutivos feminino e masculino ocorre na fase fetal, as anomalias podem estar relacionadas ao aumento da exposição a substâncias estrogênicas no útero.

Algumas disfunções sexuais são verificadas em recém-nascidos cujas mães tiveram contato com substâncias suspeitas de serem desreguladores endócrinos. Alguns efeitos relatados dessas substâncias podem afetar não só os indivíduos expostos, como também a população ou sub-população a que pertencem, pelos efeitos propagados na sua descendência.

Alguns pesquisadores acreditam que essas evidências são ainda pequenas ou não existem. Mas o ponto principal da questão é se há evidências significativas de que essas substâncias possam causar efeitos danosos em humanos e outros animais e se há níveis suficientes no meio ambiente para exercerem esses efeitos (Bila e Dezotti, 2007)

Mas enquanto concentrações tão baixas quanto $0,1$ a 10 ng.L^{-1} dos hormônios mais potentes (estradiol e etinilestradiol) são suficientes para exercer efeitos estrogênicos sobre animais aquáticos e silvestres, nos seres humanos os níveis ambientais de exposição normalmente registrados, pelo consumo de água e dieta alimentar ou por uso terapêutico são considera-

velmente menores que a produção humana diária de hormônio exógenos. (Routledge et al, 1998; Fritsche et al, 1999)

5.4 - Níveis de Hormônios no Meio Aquático e em Esgotos Domésticos

5.4.1 - Águas superficiais

As descargas de esgotos domésticos e agrícolas e resíduos antropogênicos, são as principais fontes de lançamento de estrógenos no ambiente aquático. (Desbrow et al, 1998; Ternes et al, 1999^{a,b}; Baronti et al, 2000; Belfroid et al, 1999; Johnson e Williams, 2004).

Em águas e nos esgotos domésticos, os níveis de estrógenos registrados têm sido quase sempre inferiores a 100 ng.L^{-1} . (Ying et al, 2002; Johnson e Williams, 2004; Baronti et al, 2000; Desbrow et al, 1998; Petrovic et al, 2002).

Estudos realizados em vários países da Europa indicaram que nas águas superficiais as concentrações de estrógenos eram, em geral, menores que $5,0 \text{ ng.L}^{-1}$. (Baronti et al, 2000; Belfroid et al, 1999; Kuster et al, 2008).

Um extenso monitoramento conduzido em 109 rios japoneses, compreendendo os meses entre o outono e verão, confirmaram a presença do hormônio 17β -estradiol (E2) em uma concentração média de $2,1 \text{ ng.L}^{-1}$ no período de verão e $1,8 \text{ ng.L}^{-1}$ no outono. O hormônio natural E1, foi encontrado no Rio Tamagawa (Tóquio) com concentração de 34 ng.L^{-1} e no Lago Kasumigaura com concentração de $0,7 \text{ ng.L}^{-1}$ (Isobe et al, 2003)

Monitoramento realizado em 11 estuários da Alemanha, detectou a presença de estro-na (E1) em 7 (sete) deles com uma concentração média de $0,3 \text{ ng.L}^{-1}$, enquanto E2 e EE2 foram detectadas somente em 4 amostras em concentrações abaixo do limite de quantificação de $1,0 \text{ ng.L}^{-1}$ (Belfroid et al, 1999).

Esteróides estrógenos também foram detectados em amostras de água potável no sul da Alemanha em concentrações médias de $0,4 \text{ ng.L}^{-1}$ de E1; $0,7 \text{ ng.L}^{-1}$ de E2 e $0,35 \text{ ng.L}^{-1}$ de EE2. (Kuch et al, 2001).

Nas águas do rio Tiber, na Itália, foi encontrado o hormônio estriol (E3) em concentração de $0,33 \text{ ng.L}^{-1}$, enquanto E2 e E1 foram detectados em concentração de 0,11 e $1,5 \text{ ng.L}^{-1}$, respectivamente.(Baronti et al, 2000).

Estudo realizado no Rio de Janeiro, por Kuster (2009^a) em diferentes cursos d'água localizados em áreas densamente populosas, não detectou concentrações superiores ao limite de detecção de $2,0 \text{ ng.L}^{-1}$.

Na tabela 5 é apresentada uma compilação dos resultados de monitoramento de hormônios esteróides realizados em águas superficiais de diferentes países.

Tabela 5 – Concentração de hormônios esteróides em águas superficiais.
(Ying et al, 2002)

Países	Hormônios (ng.L^{-1})		
	E1	E2	EE2
Alemanha	0,1 – 0,4	0,15 -3,6	0,1 – 5,1
Itália	ND – 1,5	ND – 0,1	< LD
Brasil	< LD	< LD	< LD
Espanha	NI	0,5 – 13,9	< 1,0 - 5,0
Japão	NI	0,6 – 94	NI
Holanda	ND – 140	ND – 48	ND – 8,8
Reino Unido	0,2 - 17	1,3 – 17	<0,8 – 7,6
EUA	NI	0,27 – 2,82	NI

ND = não detectado; NI = não informado; LD = limite de detecção

5.4.2 - Esgotos domésticos

Hormônios estrogênios também têm sido detectados em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto doméstico em diferentes países da Europa, Ásia e América, numa faixa de concentração bastante variável.

Alguns estudos indicam elevados teores de hormônios estrogênicos naturais em amostras de esgoto doméstico (bruto e tratado). Em geral as concentrações variam entre 49 a 80 ng/L para estrogênios no esgoto bruto e 0,8 a 4,0 ng/L para esgoto tratado. (Baronti et al, 2000; Belfroid et al, 1999; Desbrow et al, 1998; Ternes et al, 1999; Nasu et al, 2000).

Outros estudos mostram que a concentração do hormônio 17 β -estradiol (E2) em efluentes de ETEs localizadas na Alemanha, Itália e nos Estados Unidos são muito baixas, variando entre valores inferiores ao limite de detecção da metodologia adotada até concentração máxima de 5,2 ng.L⁻¹. Já o hormônio estriol (E3) foi detectado, apenas uma única vez, no afluente e efluente de uma ETE italiana. (Baronti et al, 2000; Belfroid et al, 1999; Ternes et al, 1999)

Desbrow (1998) demonstrou que tanto os estrogênios naturais 17 β -estradiol (E2) e estrona (E1) como o 17 α -etinilestradiol são responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica detectada em efluentes de ETE no Reino Unido, cujas concentrações de hormônio estrona variavam entre 1,4 a 76 ng.L⁻¹, enquanto concentrações de 3,2 ng.L⁻¹ a 55 ng.L⁻¹ encontradas para o 17 β -estradiol mostravam-se bastante similares às aquelas detectadas em efluentes de ETEs japonesas.

No Brasil, Ternes et al (1997) realizaram o monitoramento de estrogênios naturais e do contraceptivo sintético, 17 α -etinilestradiol, na ETE da Penha no Rio de Janeiro. No esgoto doméstico, os estrogênios 17 β -estradiol e estrona foram detectados em concentrações médias de 21 a 40 ng/L, respectivamente e o sintético 17 α -etinilestradiol foi detectado em concentração de 6,0 ng.L⁻¹.

A atividade estrogênica também foi detectada em afluentes e efluentes de ETE da Alemanha e Suécia, em concentrações máximas de 48 ng.L⁻¹ de E2 e 8,8 para EE2. As concentrações detectadas de E1, variaram entre 11 a 140 ng.L⁻¹. (Routledge et al, 1998).

Na Itália, a média de concentrações de estrogênio E2, E1 e EE2 em afluentes de seis ETEs que operavam com o sistema de lodo ativado foram 12, 52 e 3 ng.L⁻¹, respectivamente. (Baronti et al, 2000).

Os hormônios E2, E1 e EE2 também foram detectados em afluentes de três ETEs holandesas com concentrações de até 48 ng.L⁻¹ de E2, 140 ng.L⁻¹ de E1 e 8,8 ng.L⁻¹ de EE2 (Johnson e Williams, 2001)

Em afluentes de estações de tratamento de esgotos urbanos do Canadá, foram detectados os hormônios naturais E1 e E2 em concentrações máximas de 48 ng.L⁻¹ e 64 ng.L⁻¹, respectivamente, e o hormônio sintético EE2 foi detectado em 9 das 10 amostras de efluentes, com concentração máxima de 42 ng.L⁻¹. (Ternes et al, 1999^a)

Tabela 6 – Concentração de hormônios esteróides em afluentes de ETE (Ying et al, 2002)

Países	Hormônios (ng.L ⁻¹)		
	E1	E2	EE2
Alemanha	11 – 40	ND – 48	0,2 – 8,8
Brasil	ND – 40	ND – 31	ND – 6,0
Itália	ND – 52	ND – 12	ND – 3,0
Japão	NI	0,6 – 94	NI
Holanda	ND – 140	ND – 48	ND – 8,8
Reino Unido	1,4 - 76	3,2 - 55	NI

ND = não detectado; NI = não informado; LD = limite de detecção

No afluente da ETE de Araraquara no estado de São Paulo, foi detectada a presença do hormônio E2 em concentração de 31 ng.L⁻¹. (Araújo, 2006).

A tabela 6 apresenta um resumo dos valores encontrados em afluentes de plantas de tratamento de esgotos urbanos de diferentes países. (Ying et al, 2001)

Na tabela 7 estão transcritas as faixas de concentrações médias de hormônios naturais E1 e E2 encontradas em efluentes de ETEs de diferentes países. (Ying et al, 2002)

Tabela 7 – Concentração de hormônios esteróides em efluentes de esgoto doméstico. (Ying et al, 2002^a)

Países	Hormônios (ng.L ⁻¹)		
	E1	E2	EE2
Itália	2,5 - 82,1 (9,3)	0,44 - 3,3 (1,0)	< LD - 1,7 (0,45)
Alemanha	< LD - 70 (9,0)	< LD - 3,0 (,LD)	< LD - 15 (1,0)
Alemanha	0,1 -18 (1,5)	0,15 - 5,2 (0,4)	0,1 - 8,9 (0,7)
Japão	NI	< LD - 55,0(13,0)	< LD - 7,0 (<LD)
Holanda	< 0,4 - 47 (4,5)	< 0,1 - 5,0 (<LD)	0,2-7,5 (< LD)
Reino Unido	1,4 - 47 (9,9)	2,7 - 48 (6,9)	<LD - 7,0 (<LD)
EUA	NI	0,47 - 3,66 (0,9)	<LD-0,76 (0,25)
Canadá	< LD - 48 (3,0)	< LD - 64,0 (6,0)	<LD - 42 (9,0)

ND = não detectado; NI = não informado; LD = limite de detecção

Valores entre parênteses = concentração média

5.5 - Tratamentos Aplicados na Remoção de Desreguladores

Endócrinos em Sistemas Aquosos

Os processos convencionais de tratamento de água e esgoto não tem se mostrado completamente efetivos para remoção de micropoluentes orgânicos. Assim, outros processos de tratamento, como por exemplo, os processos oxidativos vêm ganhando atenção no tratamento de efluentes industriais e domésticos, bem como no tratamento de água potável. Recentes estudos mostram que os processos oxidativos, tais como ozonização e os processos oxidativos avançados (POA) são tecnologias promissoras na remoção desses micropoluentes no tratamento de água potável ou de outros sistemas aquosos. Outros tratamentos, como filtração em carvão ativado, processos com membranas de nanofiltração (NF), osmose reversa (OR) e cloração, também têm sido avaliados.

Processos de NF e OR são particularmente efetivos na remoção de micropoluentes inorgânicos e orgânicos, tais como, pesticidas e estrogênios entre outros. (Vanderford et al, 2003)

A ozonização tem sido considerada como uma tecnologia promissora na remoção de estrogênios naturais e sintéticos da água potável e efluentes de ETE. Estudos indicam que os estrogênios são rapidamente oxidados em baixas doses de ozônio alcançando altas remoções (> 97%). Contudo, em alguns estudos, apesar da atividade estrogênica ter diminuído consideravelmente, uma estrogenicidade residual permaneceu, provavelmente, devido aos subprodutos de oxidação.

O sistema de filtro biológico em conjunto com o óxido de manganês (MnO_2) foi empregado na oxidação de desreguladores endócrinos, alcançando remoção de 81,7% de atividade estrogênica do 17α -etinilestradiol em solução aquosa. (Rudder, 2004).

O uso de processos de filtração com carvão ativado, comumente usado no tratamento de água potável para remoção de micropoluentes, tem sido investigado na remoção de desreguladores endócrinos, tais como, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e bisfenol A. Os resultados mostram que é possível alcançar remoções superiores a 99 % em baixíssimas concentrações iniciais do poluente. (Zhang et al, 2008)

É de suma importância avaliar se os tratamentos que removem efetivamente esses micropoluentes da água potável ou efluente de ETE são capazes de eliminar totalmente os efeitos deletérios que esses poluentes possam ter. A literatura relata que a atividade estrogênica de alguns desreguladores endócrinos é reduzida consideravelmente com alguns tratamentos, tais como, ozonização, cloração, fotocatalise, fotólise entre outros, contudo é relatada a permanência de um residual de atividade estrogênica no final de alguns tratamentos. (Bila e Dezotti, 2007)

5.6 - Métodos Analíticos para Identificação de Estrogênios

A análise de traços de compostos orgânicos em água é considerada como um dos maiores desafios da química analítica, da mesma forma que a determinação de hormônios estrógenos no ambiente constitui-se em tarefa difícil, não só devido à complexidade das matrizes ambientais, mas principalmente, por causa das baixas concentrações ambientais destes compostos, na ordem de $ng.L^{-1}$. (Alda et al, 2001)

Além disso, os métodos analíticos reportados na literatura são principalmente válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina. Desta forma, a análise de fármacos residuais em efluentes de ETE, em águas de rios, de solos e água potável requer ainda o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng.L^{-1} .

Na maioria das análises é necessário o enriquecimento substancial do analito para se isolar os compostos alvos da matriz e atingir os limites de detecção e quantificação requeridos. Um procedimento analítico típico inclui, portanto, vários passos para preparação da amostra, tais como filtração, extração, purificação e evaporação (Lanças, 2004).

Das várias etapas na preparação da amostra, a etapa de extração/purificação, presente em quase todos os procedimentos analíticos descritos na literatura, é o mais crítico.

Em análises de água, até alguns anos, na etapa de preparação das amostras era comum fazer a extração dos componentes de interesse utilizando a extração líquido-líquido. Porém, esse tipo de extração, além de ser trabalhosa, requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresenta custo elevado e difícil automação.

Em meados da década de 70, visando a eliminação desses problemas, uma nova técnica denominada extração em fase sólida (Solid Phase Extraction - SPE) foi desenvolvida, sendo atualmente o método mais comumente empregado (Reis Filho et al, 2006). A SPE é uma técnica de extração simples, rápida e que requer pequenas quantidades de solventes. Frequentemente são usados cartuchos ou discos de extração, comercialmente disponíveis, com uma variedade de adsorventes, tais como, C_{18} , resina de copolímero poliestireno (ENV), sílica, alumina B, CN. A SPE não é só uma técnica de extração, mas também de concentração dos componentes. Neste tipo de extração grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos são quimicamente ligados a uma superfície sólida, como sílica. A SPE pode ser desenvolvida, dependendo da espécie da amostra, por diferentes meios. Atualmente, uma grande variedade de sorbentes e derivados são comercialmente disponíveis. A seleção adequada dependerá de uma série de fatores que incluem a espécie de amostra, a seletividade e sensibilidade exigidas e custo, entre outros (Alda et al, 2001).

Na determinação de estrogênios e outros desreguladores endócrinos em amostras aquosas, os métodos analíticos publicados são frequentemente baseados na extração por fase sólida (SPE), derivatização e detecção por cromatografia gasosa/espectrometria de massa

(CG/MS), cromatografia gasosa/espectrometria de massa/ espectrometria de massa (CG/MS/MS) ou cromatografia líquida de alta eficiência/espectrometria de massa (HPLC/MS).

A extração de estrógenos e progestógenos em água é feita usualmente pela extração em fase sólida (SPE) em discos, ou mais freqüentemente em cartuchos, sendo o octadecilsilano (C18) quimicamente ligado à sílica o adsorvente mais amplamente empregado e em menor escala com sorventes poliméricos de carbono preto grafitizado (GCB). (Ternes, 2001).

Para amostras sólidas, é por vezes necessário preceder a extração por uma secagem a frio ou moagem e homogeneização da amostra. A extração segue então, usando-se uma variedade de alternativas como Soxhlet, extração assistida em microndas, agitação mecânica ou ultrasonificação (Gomes et al, 2009).

Para determinação de EDCs, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) tem sido a técnica mais comumente empregada, uma vez que apenas há poucos anos a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) tem ganhado popularidade.

O pré-requisito necessário para análise em cromatografia gasosa é que o analito de interesse seja volátil e termicamente estável. Quando não for o caso, a derivatização pode ser usada para superar esta limitação. Tradicionalmente, a cromatografia gasosa necessita do uso de derivados para determinar compostos estrogênicos. As desvantagens da derivatização são o trabalho intensivo de laboratório e a possibilidade de redução da recuperação do analito, pois a hidrólise dos conjugados para estrógenos livres via derivatização, pode compor erros nos estágios de recuperação, extração e quantificação, devido à baixa eficiência no passo de hidrólise. O tempo de consumo na etapa de derivatização e a possível perda do analito têm levado a considerar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC: “*High Pressure Liquid Chromatography*”) como preferida para determinação de estrógenos (Reis Filho, 2006).

A cromatografia líquida é uma importante técnica de separação, de grande aplicabilidade e adequação para espécies não voláteis ou termicamente instáveis, e tem sido aplicada para separar compostos como corantes polares, proteínas, íons metálicos, metabólicos de plantas, isômeros e fármacos, entre eles, hormônios esteróides. O emprego de altas pressões diferencia a HPLC da cromatografia líquida clássica que opera à pressão ambiente. A HPLC é

uma técnica de ultra-micro análise podendo, dependendo da substância e do detector empregado, quantificar massas de componentes inferiores a 10^{-18} g. (Ciola, 2006)

Apresenta várias vantagens para análise de compostos orgânicos em água. Uma delas é que os compostos voláteis representam uma pequena fração de compostos orgânicos contidos em água e esgotos. A maior parte do carbono está presente como composto não volátil, que pode ser diretamente analisado pela cromatografia líquida e não pela gasosa. Isto é especialmente verdadeiro para esgotos, que contêm muito material húmico e compostos orgânicos polares, tais como carboidratos (Filho et al, 2006).

Atualmente, equipamentos sofisticados como LC/MS e LC-MS/MS são considerados mais promissores para a análise de hormônios esteróides. O LC/MS combina a capacidade de separação física do HPLC com a capacidade analítica do espectrômetro de massas.

A literatura também relata o uso de técnicas biológicas na identificação e quantificação de estrogênios naturais e sintéticos, tais como, ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) e radioimunoensaio (RIE). O ensaio de ELISA que é baseado no uso de antígenos, tem sido descrito como um método altamente sensível e seletivo para análise de estrogênio e outros desreguladores endócrinos em ambientes aquáticos. O ensaio de ELISA é usado em conjunto com técnicas de extração, como SPE, para aumentar seu limite de detecção (Birkett e Lester al, 2003).

6 - MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho apoiou-se estruturalmente no subprojeto: *Fertirrigação utilizando esgoto sanitário tratado e seu impacto sobre os recursos hídricos* constante do projeto de pesquisa - PROSAB 02/2006: “Tecnologias sustentáveis de tratamento de esgotos sanitários e reuso agrícola”.

O projeto foi desenvolvido na Estação Experimental de Tratamento de Águas Residuárias Urbanas do IPH/UFRGS, localizada nas dependências da ETE São João – Navegantes do Departamento Municipal de Água e Esgotos - DMAE / Porto Alegre, RS e compreendeu as etapas de coleta e preparação de amostras de esgoto doméstico (na forma bruta e seus efluentes tratados), colheita e preparação das amostras da cultura de milho irrigada e determinação da concentração dos hormônios por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

6.1 - Caracterização do Local de Estudo

6.1.1 - Descrição geral da estação experimental

A Estação Experimental de Tratamento de Águas Residuárias Urbanas é constituída por dois sistemas de tratamento identificados como Sistema 1 e Sistema 2, alimentados pelo afluente bruto da ETE São João.

O sistema 1 é constituído por um reator UASB (digestor anaeróbio de fluxo descendente) seguido de lagoa de polimento convencional.

As unidades do sistema 1 foram operadas com alimentação contínua de $1,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. A caracterização química desses efluentes encontra-se no anexo I deste trabalho.

O sistema 2 é constituído por um reator anaeróbio híbrido seguido de lagoa de polimento dotada de material suporte para desenvolvimento de biofilme (perifíton). Os efluentes deste sistema não foram utilizados no processo de fertirrigação.

A ETE São João – Navegantes opera com vazão média de 300 L s^{-1} atendendo uma população de 140.000 habitantes distribuída nas bacias do Arroio Areia, Humaitá, Almirante Tamandaré e Aeroporto Salgado Filho. O tratamento adotado é o de lodos ativados e os efluentes tratados são lançados no rio Gravataí contribuinte do lago Guaíba, pela sua margem esquerda.

6.1.2 - Descrição geral do projeto de fertirrigação

O experimento de fertirrigação agrícola foi realizado em duas parcelas situadas na área da ETE, empregando efluente tratado em dois níveis de qualidade, a saber: efluente do reator anaeróbio (UASB) e efluente da lagoa de polimento após passagem pelo reator UASB. Como testemunho para fins de comparação, uma terceira parcela foi irrigada com água tratada. O sistema de irrigação foi por sulcos, que se caracteriza pela aplicação de água no solo através de pequenos canais abertos ao longo da superfície do terreno, com quatro repetições, conforme apresentado na figura 3.

Cada uma das parcelas media $21 \text{ m} \times 15 \text{ m}$, totalizando 315 m^2 e área total ocupada igual a 945 m^2 , sendo cada parcela formada por 4 sub-parcelas ou canteiros de $4,5 \text{ m}$ de largura por $15,0 \text{ m}$ de comprimento com espaçamentos de $1,0 \text{ m}$ entre eles. Em cada canteiro foram plantadas 8 fileiras de milho espaçadas a cada $0,5 \text{ m}$.

Os efluentes foram aplicados de forma a manter a umidade do solo entre a capacidade de campo e o limite hídrico inferior do milho. Foram utilizadas sementes de milho híbrido, semeadas em linhas. O milho foi selecionado por se tratar de uma cultura nobre de ampla utilização na alimentação humana e animal.

No anexo II deste trabalho, encontram-se fotos das parcelas em diferentes fases do cultivo.

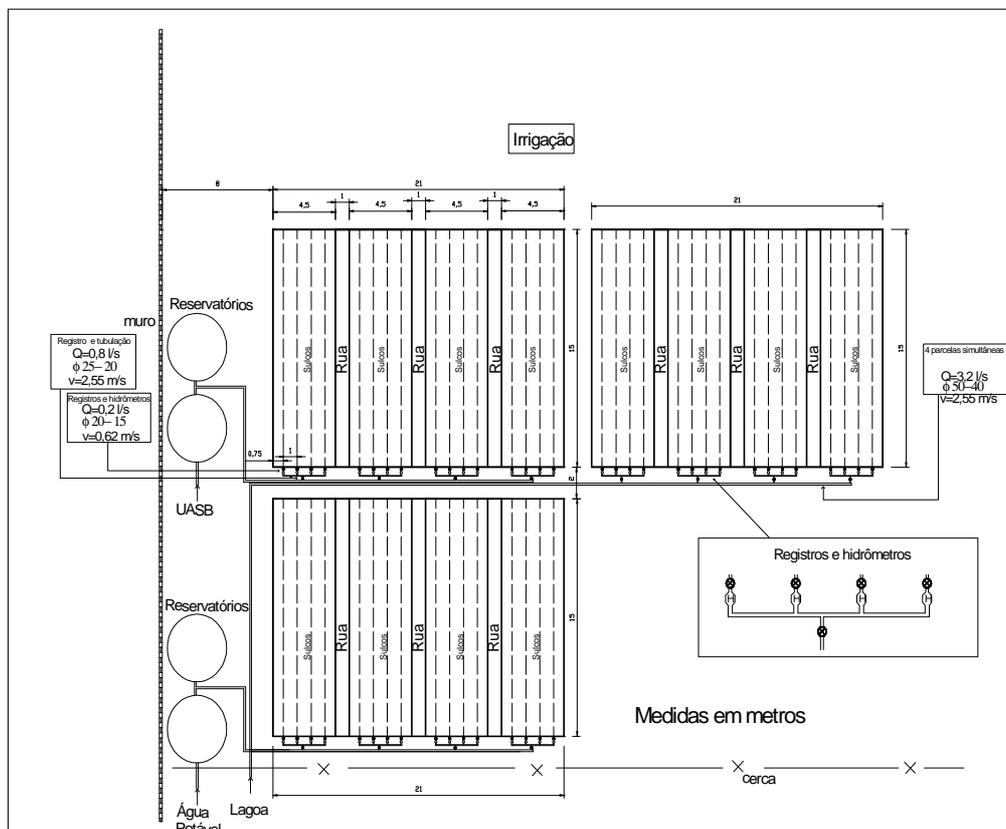


Figura 3 – Parcelas experimentais do sistema de irrigação
Fonte: Relatório Final _ PROSAB 02/2006

6.2 - Materiais e Equipamentos Utilizados

6.2.1 - Extração em fase sólida e filtros:

- Cartuchos SPE Chromabond, PP C₁₈ (70 ml, 100g), Machery Nagel (MN)
- Cartuchos Sulpelclean LC – Florisil (1g, 6ml), Machery Nagel (MN)
- Papel filtro qualitativo
- Membrana de fibra de vidro – GF-4 ($\phi = 2,7\mu\text{m}$), 47 mm, Macherey Nagel (MN)

6.2.2 - Solventes e reagentes:

- Hexano, grau HPLC - MERCK
- Metanol, grau HPLC - MERCK
- Acetona, grau HPLC - MERCK
- Diclorometano, grau HPLC - MERCK
- Acetato de etila, grau HPLC – MERCK
- Água super pura - Milli-Q.

6.2.3 - Padrões analíticos:

Padrões dos hormônios fornecidos por Sigma-Aldrich – USA, com pureza acima de 98%. Foram utilizados sais contendo os hormônios: estrona (E1); 17 β -estradiol (E2); 17 α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3).

6.2.4 - Instrumentação - Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC em inglês) da marca Shimadzu modelo LC-20AT, equipado com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (DAD) e coluna de fase reversa C-18 modelo Shim-pacK (CLC-ODS (M) com 4,6mm x 250 mm e diâmetro de partícula de 5 µm.
- Sistema Supelco (manifold) de extração a vácuo.
- Extrator Soxhlet
- Sistema Uniclean para degazeificação de solventes

6.3 - Amostras e Soluções

6.3.1 - Esgoto doméstico

As amostras de esgoto doméstico na forma bruta (identificada pela sigla EB) e dos efluentes tratados (identificadas respectivamente por EUASB e EL) foram coletadas no período em três diferentes pontos, a saber:

- Ponto EB: chegada do esgoto bruto a ETE experimental.
- Ponto EUASB: saída do efluente do reator UASB (Sistema 1).
- Ponto EL: saída do efluente da lagoa de polimento (Sistema 1).

As amostras foram coletadas entre janeiro a julho de 2008, em 12 campanhas com frequência quinzenal, por amostragem simples, em triplicata, num total de 36 amostras coletadas por ponto de amostragem. As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 1,0 litro, segundo metodologia de Barceló et al (2001) e Ingrand et al (2003). Após a coleta as amostras eram refrigeradas e imediatamente conduzidas ao laboratório aonde permaneciam resfriadas a 4 °C até a análise. O período de coleta de efluentes se estendeu após a colheita do milho, porém, neste período não foram verificadas mudanças significativas na composição do esgoto.

6.3.2 - Amostras de milho

A colheita de milho foi realizada em janeiro de 2008. Para a análise dos grãos de milho foram coletadas espigas colhidas em 5 fileiras centrais de cada canteiro com uma área útil de 10 m² (2,5 m x 4,0 m). Os caules, folhas, pendões e espigas foram separados e levados à estufa ventilada a 65°C até peso constante. A matéria seca foi determinada mediante a coleta de quatro plantas por repetição. O plano de amostragem das espigas de milho foi definido levando-se em conta a representatividade e preservação das amostras coletadas, resultando na grade de amostragem apresenta abaixo, onde T(N) identifica o tratamento, B(N) identifica o bloco de coleta e R(N) a repetição correspondente:

1 - Parcela testemunha irrigada com água tratada – T1

T1B3R1	T1B3R2	T1B3R3	T1B3R4
T1B2R1	T1B2R2	T1B2R3	T1B2R4
T1B1R1	T1B1R2	T1B1R3	T1B1R4

2 - Parcela irrigada com efluente do UASB – T2

T2B3R1	T2B3R2	T2B3R3	T2B3R4
T2B2R1	T2B2R2	T2B2R3	T2B2R4
T2B1R1	T2B1R2	T2B1R3	T2B1R4

3 - Parcela irrigada com efluente da lagoa de polimento – T3

T3B3R1	T3B3R2	T3B3R3	T3B3R4
T3B2R1	T3B2R2	T3B2R3	T3B2R4
T3B1R1	T3B1R2	T3B1R3	T3B1R4

Após a colheita as espigas foram debulhadas e os grãos secos em estufa ventilada a 65°C durante 24h. Após pesagem, os grãos foram moídos em moedor mecânico. As farinhas resultantes desta moagem foram identificadas de acordo com sua célula de origem, embaladas a vácuo e congeladas.

6.3.3 - Esgoto sintético

Para efetuar o estudo de recuperação, foi utilizada uma amostra controle de esgoto sintético, livre dos analitos de interesse, simulando a composição dos esgotos sanitários. O esgoto sintético foi preparado a partir da mistura de compostos de proteínas, carboidratos, lipídeos e enriquecido com soluções de sais minerais e metais, cujas proporções estão relacionadas na tabela 8.

Tabela 8 - Composição do esgoto sanitário sintético

Composto	Fonte - Substância	Concentração (mg.L ⁻¹)
Proteína	Extrato de carne	208
Carboidratos	Sacarose	35
	Amido	114
	Celulose	34
Lipídeos	Óleo de soja	51
	Cloreto de sódio – NaCl	250
Sais minerais	Cloreto de magnésio – MgCl ₂ .6H ₂ O	7
	Cloreto de cálcio – Ca Cl ₂ .2 H ₂ O	4,5

Fonte: Adaptado de Araújo, 2006.

Além destes compostos, foi adicionado ainda bicarbonato de sódio (NaHCO₃) para corrigir o pH. Adicionou-se ainda, 3 gotas de detergente comercial, com o objetivo de emulsificar as gorduras. Os componentes orgânicos foram dissolvidos em 1,0 litro de água do sistema público de abastecimento e depois fervido durante aproximadamente por 2 horas com agitação contínua para garantir a homogeneização das soluções.

6.3.4 - Solução estoque e solução padrão

Uma solução estoque de 100 mg.L^{-1} contendo os hormônios de interesse, foi preparada pela dissolução de 10 mg de cada um dos compostos (sais) em 100 ml de metanol.

Uma solução padrão com concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi preparada por diluição de 10 ml da solução estoque em 1000 ml de metanol.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e estocadas a 4°C .

6.4 - Procedimentos para Extração dos Analitos de Interesse por SPE

Devido à complexa composição do esgoto doméstico e das baixas concentrações de estrogênios esperadas, foi necessário executar preparação e condicionamento prévio das amostras, antes de submetê-las à leitura por cromatografia em HPLC. Adotou-se a metodologia descrita em trabalhos publicados por Barceló et al (2001) e Ingrand et al. (2003), cujos procedimentos analíticos de extração e concentração do analito de interesse foram aplicados nas amostras do esgoto doméstico na forma bruta e tratada, nas amostras dos grãos de milho e nas amostras de esgoto sintético.

6.4.1 - Amostras de efluentes domésticos

Antes da extração, as amostras de efluentes (termicamente ambientadas) foram filtradas a vácuo, inicialmente em papel filtro qualitativo para eliminação de sólidos mais grosseiros e, posteriormente, por membranas GF-4 para evitar o entupimento dos cartuchos de extração. Em seqüência, para garantir a total eluição dos analitos, os filtros foram lavados (2x) com 5,0 ml de acetona. Os extratos de acetona coletados foram combinados a 1,0 litro de filtrado e levados para a etapa de extração através da passagem por cartuchos C18 em manifold a vácuo.

Antes da passagem das amostras pelos cartuchos C-18, os mesmos foram condicionados com adições seqüenciais de 10 ml de hexano, 10 ml de acetato de etila, 10 ml de metanol e 20 ml de água Milli-Q, em uma razão de fluxo de 3 ml.min^{-1} . Após a passagem da amostra os cartuchos foram secos a vácuo (40 a 50 KPa) por aproximadamente 1,0 (uma) hora.

Os analitos de interesse foram então, eluídos dos cartuchos com 6,0 ml de solução de acetato de etila / metanol (5:1, v/v). O extrato coletado foi reduzido à secura sob fluxo de nitrogênio e em seguida reconstituído em 2,0 ml de etil-acetato.

Para eliminar interferências hidrofílicas (tais como substâncias húmicas) foi feita uma separação líquido-líquido. O extrato de acetato de etila foi extraído (2x) com 1,0 ml de solução aquosa de cloreto de sódio a 5 % (p/v).

Os extratos orgânicos foram combinados e percolados por cartuchos de sulfato de sódio anidro. Os cartuchos de sulfato de sódio anidro foram lavados (2x) com 2,0 ml de acetato de etila e o extratos coletados foram submetidos à secagem sob fluxo de nitrogênio.

O extrato seco foi reconstituído com solução de hexano + cloreto de metila (1:1, v/v) a um volume final de 2,0 ml e purificados em cartuchos LC-Florisil, previamente condicionados por passagem seqüencial de 10 ml de hexano e 10 ml de cloreto de metila. A eluição foi feita com 7,0 ml de solução (95:5, v/v) de cloreto de metila e acetona. Após a eluição e secagem sob fluxo de nitrogênio, o extrato foi reconstituído em uma solução de 50 µL de metanol e 150µL de água milli-Q. Após homogeneização foi feita a análise cromatográfica.

A seqüência dos procedimentos analíticos está representada no fluxograma da Figura 4.

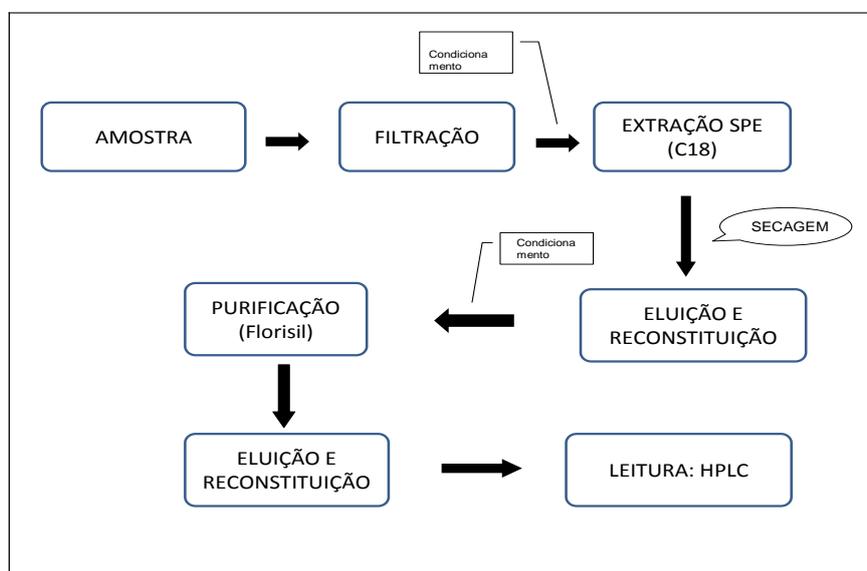


Figura 4 - Fluxograma do procedimento de extração em fase sólida (SPE)

6.4.2 - Amostras de milho

As amostras de milho, representadas pelas farinhas de moagem foram inicialmente submetidas a um processo de extração sólido-líquido preliminar em extrator Soxhlet utilizando o hexano como solvente. Este procedimento visou separar os extratos lipídicos contidos nos grãos de milho dos hormônios esteróides e foi aplicado de forma similar ao processo de extração de óleos e graxas em amostras de lodos e amostras sólidas ou semi-sólidas, descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20^a edição.

Primeiramente, cada amostra de farinha armazenada foi ambientada, homogenizada e quarteada. Cada fração representativa selecionada foi, então, pesada e acondicionada em um cartucho individual confeccionado com filtro de papel comum, para melhor acomodar a amostra no Soxhlet. A extração foi executada em um ciclo operacional de 4 horas, correspondendo a 20 ciclos / hora. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Ao término do ciclo operacional de extração, o eluente correspondente foi submetido à extração em SPE e purificação em Florisil, em procedimento análogo ao adotado para extração e purificação das amostras dos efluentes líquidos.

6.4.3 - Esgoto sintético

Inicialmente, as amostras de esgoto sintético foram dopadas com concentração conhecida dos hormônios de interesse. Foram tomadas 4 replicatas de 1000 ml de esgoto sintético e em três destas amostras foram adicionados 100 µL da solução padrão. A amostra isenta da adição de hormônios serviu como controle do processo. A seguir, todas as amostras foram homogenizadas, termicamente ambientadas e filtradas a vácuo em membrana GF-4. Proce- deu-se, então, à etapa de extração, como descrito na seção 6.4.1.

6.5 - Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas operacionais do cromatógrafo de trabalho foram determinadas experimentalmente. O comprimento de onda mais adequado foi selecionado a partir

da comparação de espectros de absorção obtidos em uma varredura de 200 a 800 nm. O comprimento de onda selecionado correspondeu ao máximo de absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$)

As condições para a separação cromatográfica como composição e fluxo da fase móvel foram estabelecidas utilizando-se soluções-padrão individuais e mistura de padrões. A composição da fase móvel foi selecionada por comparação dos resultados obtidos para mistura de metanol/água e acetonitrila/água em proporções variáveis desde 30% a 100% dos solventes orgânicos, tanto no modo isocrático como no gradiente. O fluxo da fase móvel foi determinado avaliando-se variações entre 0,2 a 1,0 ml min⁻¹.

6.6 - Avaliação do Método Analítico

Algumas características qualitativas de desempenho, como: seletividade, linearidade de resposta do detector, sensibilidade e precisão foram avaliadas, respectivamente, em termos das curvas de calibração, limites de detecção e quantificação e testes de recuperação dos analitos.

6.6.1 - Seletividade

A seletividade do método foi analisada através da comparação dos picos de resposta obtidos para injeção de extratos brancos de esgoto sintético e de extratos dopados com alta concentração de hormônios, após aplicação do método de extração proposto.

6.6.2 - Determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados experimentalmente através de análise de misturas padrão, contendo os hormônios estrona (E1) 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3) em concentrações decrescentes. Foram executadas nove injeções da solução e mistura de padrões.

O limite de detecção (LD) definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, nas condições estabelecidas de trabalho, foi estimado pela relação sinal – ruído igual a 3:1. O limite de quantificação (LQ) definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada, nas condições de trabalho, com exatidão e precisão foi estimado pela relação sinal - ruído 10:1.

6.6.3 - Curvas de calibração

Na ausência de uma legislação que regule ou limite a concentração máxima permitida desses contaminantes em mananciais hídricos e/ou em esgotos urbanos, avaliou-se a linearidade do método considerando-se concentrações em nível de traços e em altas concentrações.

A linearidade foi determinada a partir das curvas de calibração obtidas pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados, para misturas de calibração. Foi utilizada uma mistura de calibração com cinco níveis de concentração próximos aos limites de quantificação dos hormônios. Foram testadas duas faixas de concentração – alta: 1 a 20 mg L⁻¹ e baixa: 0,02 a 0,12 mg L⁻¹ com cinco pontos de calibração em cada uma das faixas.

As curvas foram preparadas pela diluição de quantidades apropriadas da solução de trabalho de forma a alcançar as concentrações individuais de hormônios. Foram feitas triplicatas para cada uma das faixas testadas.

6.6.4 - Avaliação da precisão do método através do nível de recuperação dos analitos de interesse pelo método SPE

A precisão do método foi avaliada pelo nível de recuperação dos analitos, aplicando-se o método de extração proposto em amostras de esgoto sintético dopadas (enriquecidas) com uma concentração conhecida de cada um dos hormônios estudados. O nível de recuperação correspondeu à razão da concentração experimental e à concentração teórica.

O procedimento experimental constou da adição de 100 µL da solução padrão na matriz de esgoto sintético, de forma que a concentração final dos analitos após a etapa de extração fosse de 10 mg L⁻¹. Foi realizado o procedimento de extração conforme metodologia ado-

tada, no entanto, o volume final de injeção foi alterado para 1,0 ml mantendo-se a proporção original de metanol/água.

Para avaliar possíveis efeitos sinérgicos da matriz de esgoto doméstico sobre a eficiência de recuperação dos analitos, paralelamente, desenvolveu-se procedimento análogo de dopagem em uma matriz real de esgoto doméstico, usando amostra do esgoto bruto da estação experimental.

7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados, referem-se tanto à análise qualitativa executada para estabelecer condições e parâmetros experimentais de análise como à análise quantitativa executada para estimar a presença de hormônios nas amostras consideradas no item 6.3.

7.1 - Determinação das Condições Cromatográficas

7.1.1 - Seleção do comprimento de onda

Através da comparação de espectros de absorção obtidos em uma varredura de 190 a 300 nm, selecionou-se o comprimento de onda de 200 nm, como o mais adequado para a determinação analítica dos hormônios estudados. O comprimento de onda selecionado correspondeu ao máximo de absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$) para todos os hormônios estudados. Como exemplo, é apresentado o espectro obtido para o hormônio natural 17β -estradiol (Figura 5).

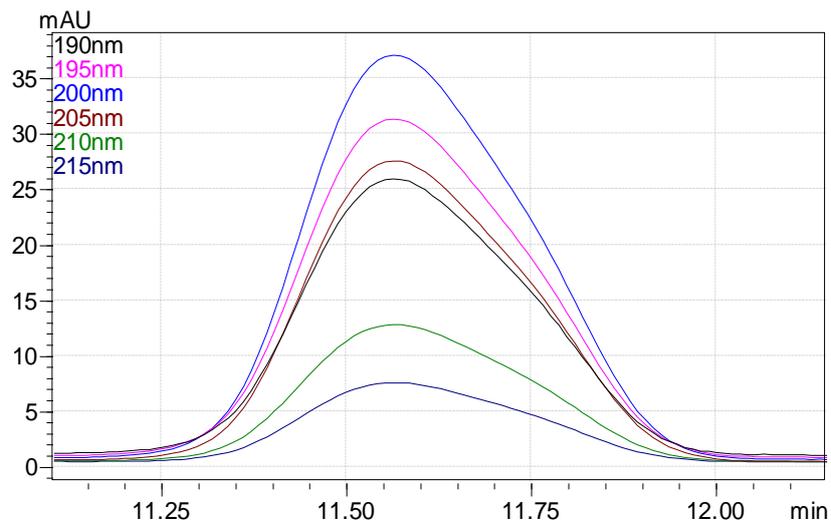


Figura 5 - Espectro do hormônio natural 17β-estradiol

7.1.2 - Condições operacionais

As condições cromatográficas de operação selecionadas correspondem a:

- composição da fase móvel: acetonitrila/água; com proporção de 45/55
- modo: isocrático
- fluxo da fase móvel: 1 ml.min⁻¹
- volume de injeção: 20 µL

A figura 6 apresenta um cromatograma resultante da injeção de uma mistura de padrões, em concentração de 20 mg.L⁻¹ de cada um dos hormônios, com as condições cromatográficas estabelecidas para o método adotado.

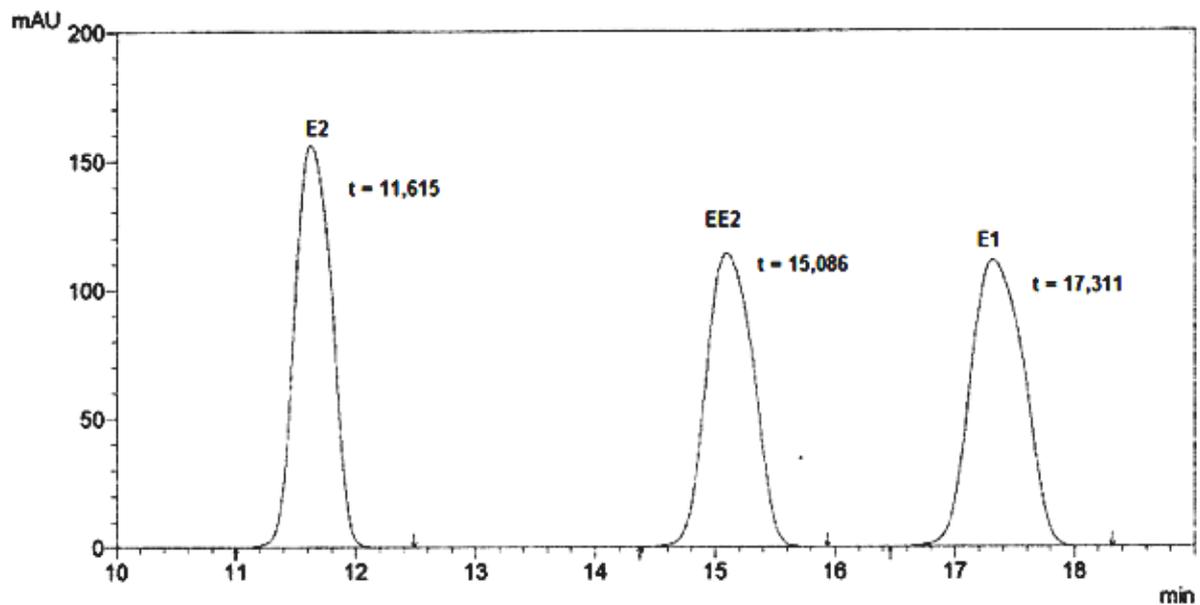


Figura 6 - Cromatograma de uma mistura de padrões, com concentração igual a 20 mg.L⁻¹ de estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2).

Conclusão parcial: A boa separação dos hormônios estrona (E1); 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) observada no cromatograma indica que não houve co-eluição das espécies, permitindo afirmar que as condições experimentais estabelecidas foram adequadas para a separação analítica dos hormônios estudados.

Os picos de resposta que identificam a eluição dos hormônios estrona (E1), 17(-estradiol (E2) e 17(-etinilestradiol (EE2) foram obtidos em 17,311 minutos; 11,615 minutos e 15,086 minutos, respectivamente.

A eluição do hormônio estriol (E3) não pode ser identificada com clareza, desta forma, este hormônio foi excluído das determinações posteriores.

7.2 - Avaliação do Método Proposto

As adequações à metodologia proposta foram avaliadas em termos da seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Os resultados obtidos são discretizados a seguir.

7.2.1 - Seletividade do método proposto

Para testar a seletividade do método proposto, foram comparados os picos de resposta obtidos quando da injeção de um extrato de esgoto sintético branco (sem adição de hormônios) e de um extrato dopado com uma concentração conhecida de hormônios, após aplicação do método de extração.

No cromatograma obtido para o extrato branco, apresentado na figura 7, não foram observados, durante o tempo de corrida, picos de resposta para os hormônios estudados. Os picos iniciais são característicos do solvente e de impurezas.

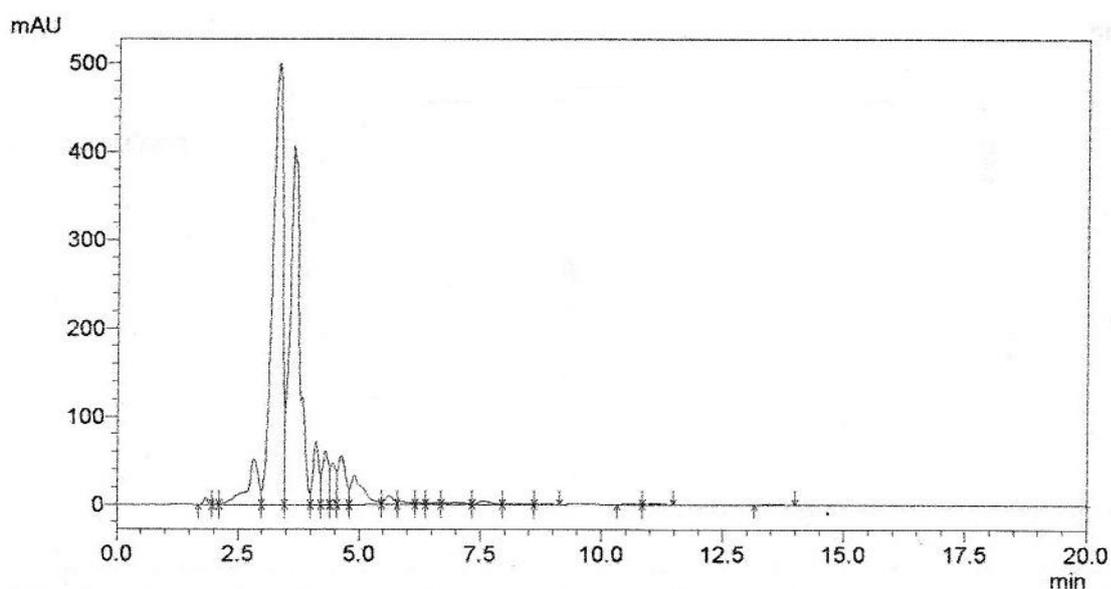


Figura 7 - Cromatograma do extrato branco de esgoto sintético.

Já na figura 8 que apresenta o cromatograma obtido quando da injeção de uma amostra de esgoto sintético dopada, são observados picos de respostas nos tempos adequados à eluição de cada um dos hormônios, sem co-eluição de interferentes com os analitos de interesse.

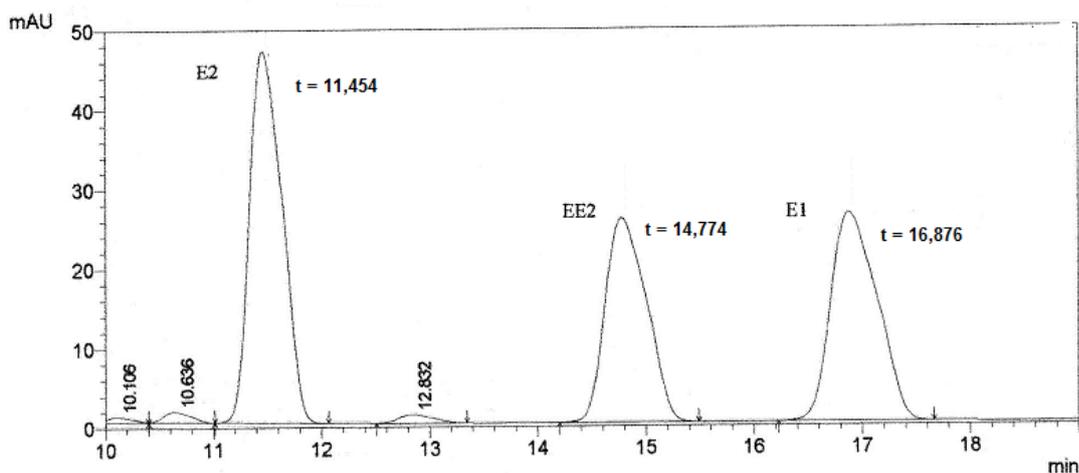


Figura 8 - Cromatograma do extrato de esgoto sintético dopado

Conclusão parcial: O método apresenta boa seletividade, visto que nenhum interferente presente na matriz eluiu no tempo de retenção dos analitos de interesse.

7.2.2 - Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise de uma solução contendo padrões dos hormônios estudados. Os resultados apresentados na tabela 9, mostram que não há diferenças significativas entre os limites de detecção dos hormônios considerados. O mesmo observa-se em relação aos limites de quantificação.

Tabela 9 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos hormônios

Hormônios	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Estrona (E1)	0,005854	0,01958
17β-estradiol (E2)	0,008484	0,02828
17α-etinilestradiol (EE2)	0,005352	0,01784

Considerando os limites de quantificação, que representam a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão e relacionando-os com o fator de pré-concentração estabelecido pelo procedimento analítico, pode-se estimar que o método desenvolvido permite a análise de amostras com concentrações de 3,916 ng L⁻¹ de estrona (E1); 5,656 ng L⁻¹ de 17β-estradiol (E2) e de 3,568 ng L⁻¹ do hormônio sintético 17α-etinilestradiol (EE2). Os valores encontrados são próximos àqueles detectados, por diferentes trabalhos, em ambientes aquáticos. Estudos realizados em águas naturais de vários países da Europa indicam usualmente concentrações inferiores a 5,0 ng L⁻¹ (Kuster et al, 2009).

Conclusão parcial: As condições experimentais estabelecidas permitem determinar, com exatidão e precisão aceitáveis, hormônios em concentrações compatíveis às encontradas em matrizes ambientais.

7.2.3 - Curvas de calibração

A linearidade do método foi avaliada através de curvas de calibração obtidas usando-se método de regressão linear para os níveis de concentração estudados. Em ambas as faixas de concentração estudadas foram obtidos gráficos de calibração lineares.

Para a faixa em nível de traços foram obtidos coeficientes de correlação (r^2) iguais a 0,9936 para o E1; 0,9951 para o E2 e 0,9962 para o EE2. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação (r^2) das curvas de calibração obtidas para esta faixa, estão apresentadas na tabela 10

Tabela 10 - Equações de regressão linear dos hormônios estudados

Hormônios	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação (r^2)
Estrona (E1)	$y = 142342 x - 690,97$	0,9936
17 β -estradiol (E2)	$y = 137922 x - 24,564$	0,9951
17 α -cinilestradiol (EE2)	$y = 177411 x + 640,57$	0,9962

Os coeficientes de correlação obtidos permitem aferir que nos intervalos de concentração estudados, a resposta de leitura do detector comportou-se de forma linear, pois quanto mais próximo a 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

A figura 9 apresenta a curva obtida para o hormônio natural estrona. As demais curvas analíticas obtidas para esta faixa encontram-se nos anexos III e IV deste trabalho.

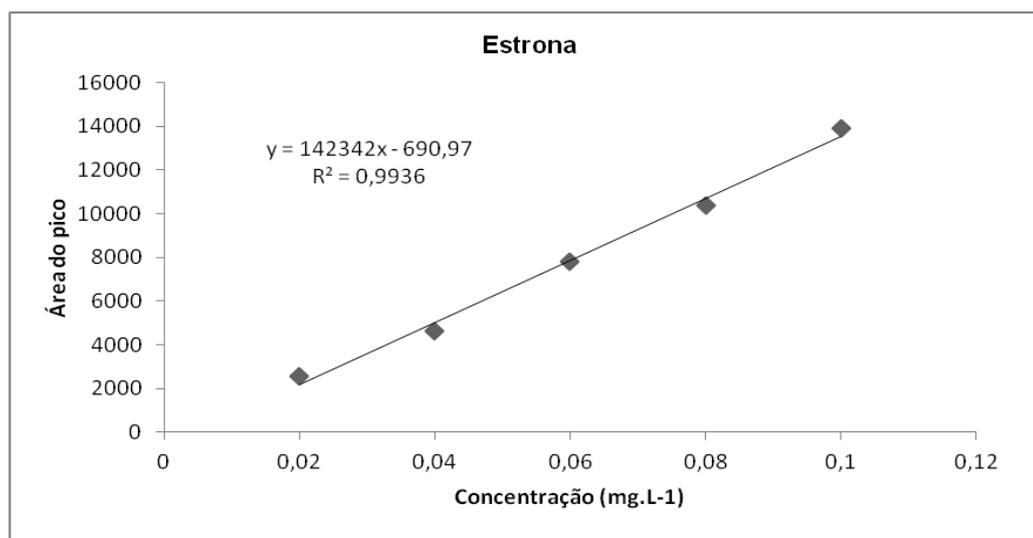


Figura 9 - Curva de calibração para o hormônio natural estrona (E1)

Para a faixa de alta concentração foram obtidos coeficientes de correlação (r^2) iguais a 0,9958 para o E1; 0,9955 para o E2 e 0,9973 para o EE2.

Conclusão parcial: Os resultados das curvas de calibração permitem aferir capacidade ao método para fornecer resultados proporcionais à concentração esperada.

7.2.4 - Avaliação do nível de recuperação dos hormônios da matriz de esgoto sintético pela técnica de extração por fase sólida (SPE)

A eficiência do processo analítico adotado foi avaliada pela recuperação dos analitos de interesse, reportada como a relação percentual entre a quantidade medida do analito após a extração e a quantidade adicionada na matriz de esgoto sintético.

Os testes de recuperação foram feitos utilizando-se amostras de esgoto sintético, previamente dopadas com uma solução contendo 10 mg L^{-1} de cada um dos hormônios estudados. Todos os demais parâmetros experimentais já estabelecidos, como modelo e condicionamento dos cartuchos, solventes, eluentes e condições cromatográficas foram mantidos. Foram feitas triplicatas das extrações e das injeções cromatográficas, conforme descrito no item 6.3.3.

Os percentuais de recuperação obtidos para E1, E2 e EE2 foram respectivamente iguais a 50,8%; 60,9% e 50,5%.

A figura 10 apresenta os níveis percentuais de recuperação dos analitos de interesse alcançados para os testes com esgoto sintético (ES) e esgoto doméstico (ED).

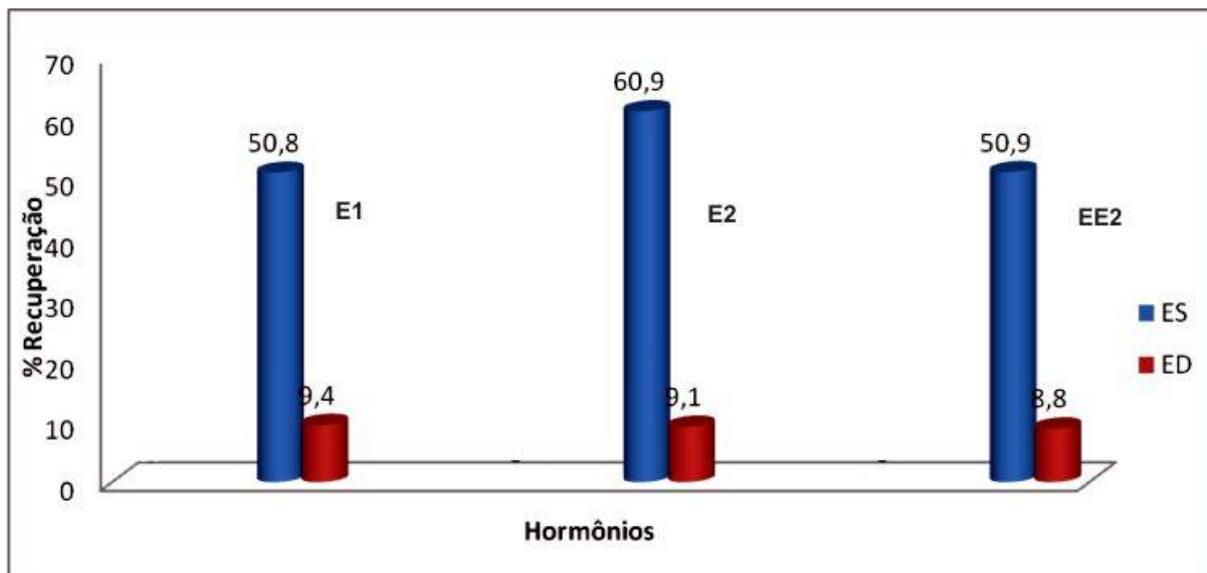


Figura 10 - Níveis percentuais de recuperação dos analitos de interesse

Resultados apresentados na literatura científica, avaliando recuperação dos mesmos analitos em procedimentos analíticos similares, variavam entre níveis de recuperação inferiores a 50% a recuperações médias superiores a 90%. Os piores resultados foram verificados quando da adoção de taxas de fluxo superiores a 500 ml min^{-1} e possivelmente estejam associados a fenômenos de lavagem dos analitos. Os resultados mais consistentes, com recuperação média aceitável em torno de 70% foram alcançados em taxas de fluxo de 100 ml min^{-1} . Recuperações superiores a 80% foram alcançadas quando da adoção de taxas de fluxo em torno de 50 ml min^{-1} , entretanto, este procedimento resultava em longos tempos de extração, usualmente superiores a 1,5 horas (Snyder et al, 1999; Ingrand et al, 2003; Kuster et al, 2009).

No desenvolvimento do trabalho aqui apresentado, não foi possível manter-se uma taxa de fluxo constante. Em função das condições operacionais da bomba de vácuo utilizada, a taxa de fluxo trabalhada variou de 10 ml min^{-1} a 40 ml min^{-1} .

De acordo com Kuster et al (2009), a eficiência de remoção pode ser consideravelmente afetada pelo pH das amostras. Para estimar a extensão deste efeito, ele desenvolveu testes usando água HPLC dopada com 100 ng L^{-1} de diferentes analitos, incluindo estrógenos, em pH de 3, 5, 7 e 9. Os resultados obtidos mostraram que a maior eficiência de extração foi obtida em pH 5 (Snyder et al, 1999; Kuster et al, 2009).

Conclusão parcial: Embora as dificuldades para controle do fluxo na etapa de extração e a ausência de ajuste do pH possam ter contribuído para que não fossem atingidos níveis de recuperação maiores, pode-se aferir que nas condições de trabalho estabelecidas o método é aplicável para extração dos analitos de interesse.

No teste de recuperação, utilizando-se como matriz uma amostra do efluente bruto da estação experimental, os níveis de recuperação não atingiram a 10% da concentração adicionada, para nenhum dos hormônios estudados.

Vários estudos têm investigado a possibilidade de que estrógenos possam ficar retidos no material filtrado (Desbrow et al, 1998; Huang et al, 2001; Fine et al, 2003).

Fine (2003), por exemplo, estudou a distribuição de três estrógenos naturais (estrona, estradiol e estriol) em amostras de lagoas, analisando a fase aquosa, a fase não dissolvida e a superfície interna dos frascos de amostragem e observou que os compostos menos polares como estrona e estradiol ficavam parcialmente adsorvidos na fase particulada.

Petrovic et al (2002) ao analisar os níveis ambientais de compostos de natureza endócrina nos sedimentos de rios, indicou a hipótese de sorção em sedimentos como bastante provável, dada a relativa baixa polaridade destes compostos que usualmente apresentam coeficientes de partição octanol/água entre 3 e 6.

Testes laboratoriais desenvolvidos para estudar o comportamento de estrógenos e progestógenos no ambiente aquático, indicam que os leitos de sedimento agem como reservatórios ambientais destes compostos, eventualmente biodisponíveis, permanecendo como uma potencial fonte de efeitos adversos através da cadeia alimentar e biomagnificação (Jurgens et al, 1999; Lai et al, 2000).

Conclusão parcial: Considerando-se a natureza hidrofóbica e baixa volatilidade destes compostos, o resultado obtido pode indicar a ocorrência de um processo de sorção dos compostos hormonais pela matéria particulada ou sedimentável contida no esgoto doméstico. Os coeficientes de partição ($\log K_{ow}$) destes compostos, também indicam um comportamento preferencial pela partição à fase sólida.

7.3 - Quantificação de Hormônios nas Amostras de Esgoto Bruto e Tratado e Grãos de Milho

Para avaliar a presença de hormônios no esgoto bruto e nos efluentes tratados usados no projeto de fertirrigação do milho foram realizadas 12 campanhas (com três triplicatas por ponto de amostragem) no período entre janeiro e julho de 2008, conforme descrito no item 6.3.1 do capítulo 6.

Todas as amostras foram submetidas ao método de extração em fase sólida e concentração de analitos e posteriormente lidas no equipamento HPLC, nas condições cromatográficas previamente estabelecidas. As planilhas com os resultados das leituras encontram-se nos anexos V e VI.

7.3.1 - Esgoto bruto

De acordo com os resultados obtidos, os hormônios estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol foram detectados em todas as amostras de esgoto bruto. Entretanto, em onze das doze campanhas realizadas, a concentração dos hormônios naturais estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) foram inferiores ao limite de detecção do equipamento utilizado, o que significa que nas condições de análise estabelecidas, as concentrações dos hormônio estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) não excederam a 1,17 ng.L⁻¹ e 1,70 ng.L⁻¹, respectivamente. Em uma campanha a concentração dos hormônios naturais estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) excederam o limite de detecção e foram detectados em concentrações iguais a 8,85 ng.L⁻¹ de estrona (E1) e 6,57 ng.L⁻¹ de 17 β -estradiol (E2). O hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) foi detectado, ao longo de todas as campanhas, em concentração inferior ao limite de detecção.

Trabalhos publicados por pesquisadores europeus, indicam que em vários países da Europa, as águas naturais usualmente apresentam concentrações de hormônios naturais e sintéticos inferiores a 5,0 ng.L⁻¹ (Baronti et al, 2000; Belfroid et al, 1999; Kuster et al, 2008).

Também Nasu et al (2001) fizeram testes em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto doméstico em diferentes cidades japonesas e encontraram concentrações de

17 β -estradiol acima do limite de detecção de 0,2 ng L⁻¹, mas sempre inferiores ao limite de quantificação de 0,6 ng L⁻¹.

No Brasil, os resultados obtidos podem ser comparados aos resultados obtidos em trabalhos realizados por Ternes et al, (1999); Araújo,J.C, (2006) e Kuster et al, (2009).

Ternes et al (1999) avaliando a eficiência do processo de tratamento da ETE - Penha no município do Rio de Janeiro, identificaram os hormônios E1, E2 e EE2 no esgoto bruto afluente em concentrações médias de 21, 40 e 6 ng L⁻¹, respectivamente.

Araújo (2006) avaliando a eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais por dois diferentes sistemas de cromatografia líquida: HPLC-DAD e HPLC-Fluorescência, identificou apenas o hormônio E2, no afluente, em concentração igual a 31ng L⁻¹, quando as amostras foram lidas pelo HPLC-Fluorescência. No sistema HPLC-DAD não foram detectados hormônios naturais e sintéticos quer seja, nas amostras de esgoto bruto ou tratado.

Ainda no Brasil, a ocorrência de hormônios esteróides em águas de áreas altamente populosas no estado do Rio de Janeiro foram verificadas por Kuster et al (2009). Foram analisadas 20 amostras coletadas nas águas dos rios Paraíba do Sul, Guandú e Macaé e em duas lagoas situadas na parte sul do estado adotando-se metodologia baseada na extração em fase sólida (SPE) seguida por separação em cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrofotometria de massa (LC-MS/MS). Nenhum dos hormônios esteróides E1, E2 e EE2 foram detectados.

Conclusão parcial: Os resultados obtidos mostram coerência com valores apresentados em trabalhos publicados na literatura científica nacional e internacional. A ocorrência ocasional dos hormônios naturais pode indicar ou que as cargas de esgoto afluíram a ETE de forma não controlada ou ainda que as amostras coletadas de forma discreta tenham produzido somente informações pontuais não permitindo detectar variações temporais.

7.3.2 - Efluentes tratados

Os efluentes tratados utilizados como fontes de irrigação, apresentaram resultados semelhantes aos encontrados para o esgoto bruto.

Nos efluentes oriundos do reator UASB que irrigaram os canteiros identificados pela sigla T2, foram identificados os hormônios E1, E2 e EE2 em concentrações inferiores aos limites de detecção em 10 das 12 campanhas realizadas. Em duas campanhas não foram identificados picos de resposta para nenhum dos analitos de interesse, permitindo aferir o valor não detectado (ND) para estas amostras.

Nas 12 campanhas para avaliação dos efluentes das lagoas de polimento que irrigavam os canteiros T3, os resultados foram semelhantes, com detecção dos hormônios E1, E2 e EE2 em concentrações inferiores aos limites de detecção, em todas as campanhas realizadas.

A remoção de estrogênios por diferentes sistemas de tratamento de esgotos é creditada, em geral, a processos de biodegradação e adsorção em lodos, com percentuais de remoção de E1, E2 e EE2 variando entre 60% a mais de 99% (Ternes et al, 1999; Baronti et al, 2000; Andersen et al, 2003).

Estudos feitos em 27 ETEs no Japão, avaliando a remoção de 15 substâncias de natureza endócrina, entre elas o esteróide E2, por diferentes sistemas de tratamento, confirmaram uma taxa de redução de 90% para a maioria das substâncias. E embora, o grau de redução varie dependendo da substância, tanto processos de sedimentação primária e tanques biológicos responderam efetivamente na redução de EDCs, não tendo sido determinado se a redução é devida à decomposição biológica ou à transferência para o lodo. (Nasu et al, 2001)

Em ETEs brasileiras que operam com sistema de tanque de aeração e filtro biológico, foram observadas remoções de 64% a 78% de EE2, de 67 a 83% de E1 e de 92 a 99% de E1 (Ternes et al, 1999).

Conclusão parcial: Embora nenhuma referência possa ser feita sobre a eficiência de remoção da matéria orgânica nas unidades de tratamento, os resultados encontrados para as amostras coletadas após o tratamento mostram-se coerentes, em decorrência dos resultados já obtidos para as amostras de esgoto bruto.

7.3.3 - Amostras de milho

A possibilidade de transferência de hormônios dos efluentes para os grãos de milho durante a fertirrigação foi investigada submetendo os grãos de milho a um procedimento analítico de extração e separação cromatográfica, análoga ao das amostras líquidas, conforme descrito no item 6.4.2.

Como se pode observar pelo cromatograma da figura 11, não foram detectados picos dos hormônios estudados nas amostras de milho cultivados nos canteiros T1 e T3, irrigados respectivamente com água tratada (testemunho) e efluente da lagoa de polimento, atribuindo-se concentração nula (ND) para estes compostos na cultura de milho.

Nas amostras colhidas na célula T2B2R3, situada no canteiro T2 irrigado pelo efluente UASB, foi detectada concentração de $1,79 \text{ ng.L}^{-1}$ do hormônio estrona (E1). Considerando a massa seca de milho utilizada no processo de extração, esta concentração corresponde a $0,03 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Nas demais células da parcela T2, não foi detectada presença dos hormônios E1, E2 e EE2.

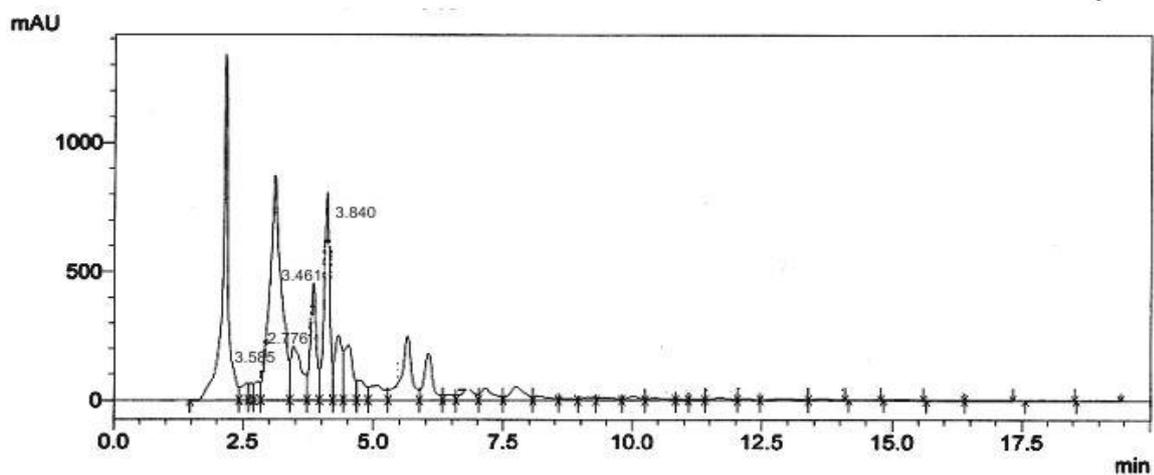


Figura 11 - Cromatograma para amostras de grãos de milho – canteiro T3

A ocorrência natural de compostos hormonais de natureza estrógena ou seus precursores tem sido inequivocamente, isolados em matéria vegetal. Técnicas de cromatografia em camada fina (TLC) e ressonância nuclear magnética, (NMR) permitiram isolar $90 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de estrona em azeite de oliva e óleo de milho, respectivamente (Hartmann et al, 1998).

Outros pesquisadores adotando técnicas mais específicas como cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa (CG-MS) isolaram compostos hormonais de natureza estrógena em vegetais como trigo, arroz, aveia e feijão entre outros (Hartmann et al, 1998; Young et al, 1978; Hewitt et al, 1979 e Fritsche et al, 1999).

Os trabalhos de Hartmann et al (1998) também confirmam a presença dos hormônios naturais estrona e 17β -estradiol, em amostras de óleo de milho, em concentrações de $0,02 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Já os estudos de Fritsch et al (1999) indicaram a ocorrência em feijões franceses de concentrações de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de 17β -estradiol e de até $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de estrona.

Estudos realizados na Alemanha revelaram que, embora, o consumo de uma dieta equilibrada contribua com uma ingestão diária de aproximadamente $0,1 \mu\text{g}$ de estrógenos (17β -estradiol + estrona), mais que 90% dos hormônios ingeridos são inativados por mecanismos primários do ser vivo, não se esperando, portanto, efeitos hormonais através da ingestão de alimentos.

Conclusão parcial: Embora as concentrações determinadas nos efluentes utilizados como meio irrigante não sejam significativas, os resultados obtidos, indicam que nas condições experimentais adotadas não houve transferência ou acumulação de hormônios nos grãos de milho. Deve-se considerar que na irrigação por sulcos, o efluente não entra em contato com as folhas ou espigas, somente com a raiz, pelo fato da distribuição deste efluente se dar por gravidade através da superfície do solo.

O resultado excludente obtido para o milho produzido na célula T2B2R3 pode ser atribuído à ocorrência natural de estrógenos no milho, visto que o valor encontrado está muito próximo de valores já isolados em amostras de milho cultivadas de forma tradicional.

8 - CONCLUSÕES

- As condições cromatográficas e operacionais selecionadas através das análises qualitativas executadas no equipamento de trabalho (HPLC-DAD) mostraram-se adequadas para separação dos hormônios estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α (-etinilestradiol (EE2)), o mesmo não ocorrendo para o hormônio estriol (E3).
- Os picos de resposta obtidos nos tempos de retenção dos hormônios estudados e os coeficientes de correlação próximos a 1,0 para todas as faixas de concentração estudadas permitem aferir seletividade e linearidade ao método analítico adotado. Os limites de detecção e quantificação encontrados mostraram-se satisfatórios.
- Os limites de quantificação encontrados confirmam a possibilidade de o método detectar concentrações dos hormônios naturais estrona (E1) e 17 β (-estradiol (E2) e do hormônio sintético 17 α (-etinilestradiol (EE2) em valores próximos àqueles encontrados no meio ambiente.
- A precisão do método avaliada, através dos níveis de recuperação dos analitos de interesse, apresentou resultados significativamente diferentes para extratos de esgoto sintético e extratos de esgoto doméstico. Os resultados confirmam considerações feitas sobre os processos de sorção dos compostos hormonais pela matéria particulada ou sedimentável contida no esgoto doméstico, indicando que os leitos de sedimentos podem agir como reservatórios ambientais destes compostos.
- Em apenas uma campanha, entre as doze (12) realizadas, foi observado nas amostras de esgoto bruto, a presença dos hormônios naturais estrona e 17 β -estradiol em concen-

trações médias, superiores ao (LQ) de $8,85 \text{ ng L}^{-1}$ e $6,57 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente. Nas demais campanhas esses hormônios foram detectados em concentrações inferiores aos respectivos limites de detecção. Os resultados obtidos mostram coerência com resultados apresentados em estudos de monitoramento de afluentes de plantas de tratamento de esgotos urbanos realizados em diferentes países europeus.

- Em todas as campanhas realizadas, a concentração do hormônio sintético 17α -etinilestradiol, nas amostras de esgoto bruto, foi inferior ao limite de detecção. A menor solubilidade desse hormônio, comparada ao dos demais, indica que esse hormônio apresenta um processo preferencial de sorção em sedimentos.
- Propriedades físico-químicas dos compostos estudados, como o coeficiente de partição, justificam a menor concentração do hormônio 17β -estradiol (E2) em relação ao hormônio estrona (E1), nas amostras onde os mesmos foram detectados em concentrações acima do limite de detecção; da mesma forma que confirma a maior tendência do hormônio 17α -etinilestradiol (EE2) à partição em sedimentos que os hormônios naturais.
- Considerando que concentrações de 1 ng L^{-1} já podem causar efeitos adversos, concentrações tão baixas quanto as identificadas na maior parte das amostras, não devem ser negligenciadas, principalmente porque ainda pouco é sabido sobre possíveis efeitos acumulativos e sinérgicos.
- A presença pontual de alguns dos hormônios no efluente bruto pode indicar que a estação experimental tenha operado, ao longo do período estudado, com cargas quali e quantitativamente não controladas de esgoto bruto afluente. Este comportamento, também pode ser justificado pela forma de coleta por amostragens discretas, que não permitem detectar variações qualitativas temporais, que no caso de efluentes domésticos podem ocorrer em minutos ou em poucas horas.
- Embora nenhuma referência possa ser feita sobre a eficiência de remoção da matéria orgânica nas unidades de tratamento, os resultados encontrados para as amostras coletadas após o tratamento mostram-se coerentes com os resultados obtidos para as amostras de esgoto bruto.

- Não foi observada ocorrência de hormônios estrona, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol, nos grãos de milho colhidos na parcela-testemunha T1 irrigada com água tratada e na parcela T3 (cultivada por irrigação com efluentes da lagoa de polimento), indicando que não houve transferência de hormônios naturais e sintéticos para os grãos de milho durante o processo de irrigação por sulcos. O mesmo foi observado para os grãos de milho produzidos pela parcela T2, irrigada com efluentes UASB, com exceção do milho cultivado na célula T2B2R3, que apresentou uma concentração de 0,03 μg do hormônio estrona (E1) por quilograma de massa seca produzida, valor próximo ao atribuído como ocorrência natural em grãos de milho produzidos de forma tradicional.

9 - RECOMENDAÇÕES

Com o intuito de contribuir para futuras pesquisas são feitas algumas recomendações, formuladas a partir das experiências obtidas durante o desenvolvimento deste trabalho:

- Avaliar a influência de parâmetros experimentais, incluindo tempo de extração, taxa de fluxo, pH da matriz e composição de solventes sobre a eficiência do processo de extração.
- Determinar o “volume de quebra” para evitar ou minimizar possíveis efeitos de lavagem do cartucho durante o processo de extração.
- Avaliar a presença de hormônios na matéria particulada, retida no processo de filtração das amostras de esgoto doméstico.
- Testar tempos de extração maiores no processo de extração sólido-líquido, bem como avaliar o nível de recuperação dos analitos de interesse nos extratos de milho obtidos neste processo de extração.
- Avaliar, para as análises quantitativas, a adoção de detectores mais sensíveis como o detector de fluorescência, bem como equipamentos atualmente considerados como mais promissores, como por exemplo, o LC - MS e LC - MS/MS.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, Vol. 911, n^o2, p. 203 – 210. 16 de mar. 2001.
- ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of strogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography A**, Vol. 938, n^o1-2, p. 145 – 153, 14 de dez. 2001.
- ALDA, M.J.L.; DÍAZ-CRUZ, S.; Petrovic, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**, Vol. 1000, n^o1-2, p. 503 – 526, 6 de jun. 2003.
- ARAÚJO, J.C.; **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara – SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos: USP, 2006. 83 p. Tese (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Química, Faculdade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ANDERSEN, H.; SIEGRIST, H.; HALLING-SORENSEN, B.; Ternes, T.A. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. **Environmental Science & Technology**, Vol. 37, no18, p. 4021 – 4026, 26 de jul. 2003.

- BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R.; Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science Technology**, v. 34, p.5059 - 5056, dez. 2000
- BELFROID, A.C.; HORST, A.V.; VETHAAK, A.D.; SCHÄFER, A.J.; RIJS, G.B.J.; WEGENER, J.; COFINO, W.P. *Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands*. **The Science of the Total Environment**, Vol. 225, n°1-2, p.101 – 108, 12 de jan. 1999.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, Vol.30, n°3, p. 651 – 666, 22 de fev. 2007.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 26, n°4, p. 523 – 530, jul. – agos. 2003.
- BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N.; **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process**, 1ª ed., Lewis Publishers, 2003.
- CEC – Commission of the European communities. On the implementation of the 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, Bruxelas, SEC(2004) 1372, 2004.
- CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia líquida de alto desempenho: HPLC. São Paulo: Edgar Blucher. 179 p (3ª Ed), 2006
- COLUCCI, M, S.; BORK, H.; TOPP, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β - Estradiol and estrone. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30, p. 2070-2076, 2001
- COLUCCI, M, S.; TOPP, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: II. 17 α - Ethynylestradiol . **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30, p. 2077-2080, 2001.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução 357/2005
- DESBROW, C.; ROUTLEDGE, J.; BRIGHTY, G.C.; SUMPTER, J.P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science & Technology**, Vol. 31, n°11, p. 1549 – 1558, 17 de abr. 1998.

- DURGBANSHI, A.; ARBONA, V.; POZO, O.; MIERSCH, O., SANCHO, J.V.; GÓMES-CADENAS, A. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, Vol. 53, p. 8437 – 8442, 2005.
- ESPERANZA, M.; SUIDAN, M.T.; NISHIMURA, F.; WANG, Z. SORIAL, G.A. Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants. **Environmental Science & Technology**, Vol. 38, n°11, p.3128 – 3035, 2004.
- FERNANDES,R.; BRESAOLA, R. Jr. Pílula anticoncepcional, um contaminante da água. *Revista BIO*, n. 55, 2010
- FILHO, R.W.R.; Araújo, J.C.; VIEIRA, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, Vol. 29, n°4, p. 817 – 822, jul. – ago. 2006.
- FILHO, R.W.R.; BARREIRO, J.C.; VIEIRA, E.M.; CASS, Q.B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Revista Ambiente & Água – Na Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Vol.2, n°3, p.54 – 61, 2007.
- FRITSCH, S.; STEINHART, H. Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. **European Food Research & Technology**, Vol. 209, n°3-4, p. 153 – 179, 3 de agos. 1999.
- FOLMAR, L.C.; HEMMER,M.; HEMMER,R.; BOWMAN,C.; KROLL,K.; DENSLOW, N.D.; **Aquatic Toxicology**, p. 49 -77, 2000
- GHISELLI, G; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, Campinas, Vol. 30, n° 3, p. 695-706, fev. 2007.
- GOMES, R.L.; AVCIOGLU, E.; SCRIMSHAW, M.D.;LESTER, J.N. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Vol.23, n°10-11, p. 737 – 744, nov – dez 2004.
- GOMES, R.L.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Vol.22, n°10, p. 697 – 707, nov. 2003.

- GOMES, R.L.; MEREDITH, W.; SNAPE, C.L.; SEPHTON, M.A. Conjugated steroids: analytical approaches and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Vol. 393, n^o2, p. 453 – 458, jan. 2009.
- HANSEN, P.D.; H. DIZER.; HOCK, B.; MARX, A.; SHERRY, J.; McMASTER, M.; BLaiSE, C. Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 17, n^o7, p. 448 – 451, agos. 1998.
- HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. **Food Chemistry**, Vol. 62, n^o1, p. 7 – 20, maio 1998.
- HESPANHOL, I. Potencial de reuso de água no Brasil: agricultura, indústria, municípios, recarga de aquíferos. **Bahia Análise & Dados**, Salvador, Vol. 13, noEspecial, p. 411 – 437, 2003.
- HUANG, Y.W.; PHILLIPS, J.R.; HUNTER, L.D. Human exposure to medicinal, dietary, and environmental estrogens. **Toxicological and Environmental Chemistry**, Vol. 89, n^o1, p. 141 – 160, 1 de jan. 2007.
- INGRAND, V.; HERRY, G.; BEAUSSE, J.; ROUBIN, M. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Vol. 1020, n^o1, p. 99 - 104, 5 de dez. 2003.
- ISOBE, T; SHIRAIISHI, H.; YASUBA, M; SHINOBA, A. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 984, p. 195 – 202, 2003
- JOHNSON, A.C.; SUMPTER, J.P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. **Environmental Science & Technology**, Vol. 35, n^o24, p. 4697 – 4703, 15 de nov. 2001.
- JOHNSON, A.C.; WILLIAMS, R.J. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone and ethinylestradiol at sewage treatment works. **Environmental Science & Technology**, Vol. 38, n^o13, p. 3649 – 3658, 19 de mar. 2004.
- KRSKA, R. JOSEPHS, R. The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Vol 369, n^o6, p. 469 – 476, mar. 2001.
- KUSTER, M; ALDA, M.J.L.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S; BARCELÓ, D. . Analysis of steroid estrogens in the environment. **Comprehensive Analytical Chemistry**, Amster-

- dam, v. 50, p. 219-264, 2007
- KUSTER, M.; AZEVEDO, D.A.; ALDA, M.J. L; NETO, A. F.R.; BARCELÓ, D. . Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Enviroment International**, New York, v. 35, n. 7, p. 997-1003. 2009
- LABADIE, P.; HILL, E.M. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Vol. 1141, n^o2, p. 174 – 181, 9 de fev. 2007.
- LAI, K. M.; JOHNSON, K.L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J.N. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science e Technology**, v. 34, p. 3890-3894, 2000.
- LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96p.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004, 46p.
- LEE, J.; LEE; B.C.; RA; J.S.; CHO, J.; KIM, I.S.; CHANG, N.I.; KIM, H.K.; KIM, S.D. Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes. **Chemosphere**, Vol. 71, n^o8, p. 1582 – 1592, abr. 2008.
- LINEY, K.E.; HAGGER, J.A.; TYLER, C.R.; DEPLEDGE, M.H.; GALLOWAY, T.S.; JOBLING, S. Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. **Environmental Health Perspectives**, Vol. 114, n^o1, p. 81 – 89, abr. 2006.
- LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.;SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environmental. **IUPAC Technical Report**, v. 75, n^o 5, p. 631-681, 2003.
- MANCUSO, P. C.; SANTOS, H. F. **Reúso da água**. Barueri : Manole. 579 p. (Ed.). 2003.
- MIERZWA, J. C.; AQUINO, S. F.; VERAS, L. R. V. Remoção de desreguladores endócrinos. In: PÁDUA, Valter Lúcio de (Coord.). **Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. Rio de Janeiro : ABES. cap. 7, p. 251-291.

- NASU, M.; GOTO, M.; KATO, H.; TANAKA, H. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. **Water Science Technology**, v. 43, n. 2, p. 101-108, 2000.
- NICHELE, J. **Utilização de efluentes sanitários tratados para o suprimento de nutrientes à cultura de milho e modificações em propriedades químicas do solo**. 2009. 75p. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009
- NOZAKI, O. Steroid analysis for medical diagnosis. **Journal of Chromatography A**, Vol. 935, n° 1 – 2, p. 267 – 278, 23 de nov. 2001.
- PETERSON, E.W.; DAVIS, R.K.; ORNDOFF, H.A. 17 β -estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. **Journal of Environmental Quality**, Vol 29, p. 826-834, 2001
- PETROVIC, M.; ELJARRAT,E.; ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D.; Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. **Journal Chromatography A**, v. 974, p. 23 - 51, out. 2002
- PETROVIC, M.; ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving rivers waters and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. **Environmental Toxicology Chemical**, v. 21, p. 2146 - 2156, 2002.
- PONEZI, A.N.; DUARTE, M.C.T.; CLAUDINO, M.C. **Fármacos em matrizes ambientais**. Disponível em <http://www.cori.unicamp.br/CT2006/trabalhos>
- PORTARIA MS n° 518/2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legislação>
- PURDOM, C.E.; HARDIMAN, P.A.; BYE, V.J.; ENO, N.C.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and Ecology**, Londres, Vol.8, n°4, p. 275 – 285, 1994.
- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, Vol. 24, n°1, p. 68 – 76, 2001.
- ROUTLEDGE, E.J. Identifying the causative agents: the use of combined chemical and biological strategies in monitoring programs. **Pure and applied chemistry**, Vol. 75, no11-12, p.2461 – 2466, 2003.

- ROUTLEDGE, E.J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G.C.; WALDOCK, S.; SUMPTER, J.P. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. **Environmental Science & Technology**, Vol. 32, n°11, p. 1559 – 1565, 17 de abr. 1998.
- RUDDER, J. D. Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynyestradiol (EE2) . *Water Research*, v. 38, n.1, p. 184-192, 2004
- SEO, J.; KIM, H.; CHUNG, B.C.; HONG, J. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Vol. 1067, n°1-2, p. 303 – 309, 4 de mar. 2005.
- SOLÉ, M.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20. p.1-8, 2001.
- SNYDER, S.A.; KEITH, T.L.; VERBRUGE, D.A.; SNYDER, E.M.; GROSS, T.S.; KANNAN, K.; GIESY, J.P. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental Science & Technology*, Vol. 33, n° 16, p. 2814 – 2820, 1999
- STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, Vol. 225, n°1-2, p. 135 – 141, 12 de jan. 1999.
- SUMPTER, J.P. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. **Toxicology Letters**, Vol. 102 – 103, p. 337 – 342, 28 de dez. 1998.
- TAGAWA, N.; TSURUTA, H.; FUJINAMI, A.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous determination of estriol and estriol 3-sulfate in serum by column-switching semi-micro high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Vol. 723, n°1-2, p.39-45, 19 de fev. 1999.
- TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, Vol. 225, n°1-2, p. 81 – 90, 12 de jan. 1999.

- TERNES, T.; WILKEN, R.D. Drugs and hormones as pollutants of the aquatic environment: determination and ecotoxicological impacts. **The Science of the Environment**, Vol. 225, n°1-2, p. 176, 1999.
- TERNES, T.A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 20, n°8, p. 419 – 434, agost. 2001.
- VANDERFORD, B.J.; PEARSON, R.A.; REXING, D.J.; Snyder, S.A. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Vol. 75, p. 6265 – 6274, 16 de out. 2003.
- YASHIN, Y.I.; YASHIN, A.Y. Analysis of food products and beverages using high-performance liquid chromatography and ion chromatography with electrochemical detectors. **Journal of Analytical Chemistry**, Vol. 59, n°12, p. 1121 – 1127, 2004.
- YING, G.; KOOKANA, R.S.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, Vol. 28, n°6, p. 545 – 551, dez. 2002.
- YING, G.; KOOKANA, R.; W, T.D. **Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) and Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in reclaimed water in Australia**. Sydney : Australian Water Association, CSIRO. 35 p, 2004.
- ZHANG, Z.; HIBBERD, A.; ZHOU, J. L.; Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: comparison between spot and passive sampling. **Anal. Chim. Acta**, v. 607, n.1, p. 37- 44, 2008

Anexo I

A. I - Caracterização dos efluentes do reator UASB e da lagoa de polimento no período de irrigação

Parâmetros	UASB	Lagoa
pH	7,25	8,37
Turbidez (uT)	78,5	51,0
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	690	528
Alcalinidade (mg L^{-1})	168,5	113,5
DBO ₅ (mg L^{-1})	92	96
DQO (mg L^{-1})	145,6	224,9
N-NTK (mg L^{-1})	27,0	14,8
N-NO ₃ (mg L^{-1})	< LD*	< LD
N – NH ₄ (mg L^{-1})	20,0	6,9
Fósforo total (mg L^{-1})	4,6	3,9
Potássio (mg L^{-1})	26,4	26,7
Cálcio (mg L^{-1})	14,3	14,2
Magnésio (mg L^{-1})	7,9	6,4
Ferro (mg L^{-1})	1,4	< LD
Manganês (mg L^{-1})	1,3	0,9
Zinco (mg L^{-1})	0,21	< LD
Cobre (mg L^{-1})	0,03	< LD
Sódio (mg L^{-1})	53,7	55,1

*LD = Limite de detecção

Anexo II

A.II - Fotos das parcelas do cultivo de milho – estação experimental



(a) 30 dias após o plantio



(b) 60 dias após o plantio



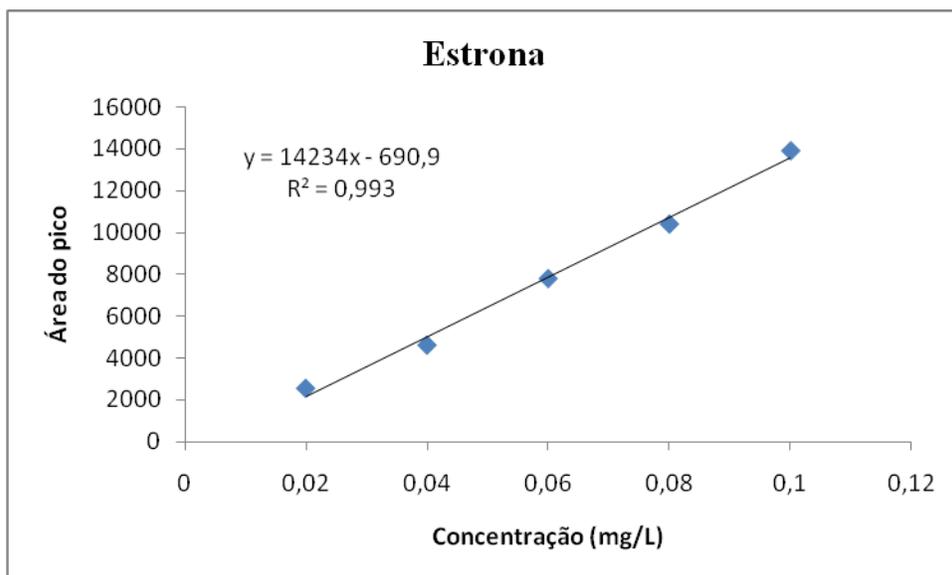
(c) 90 dias após o plantio



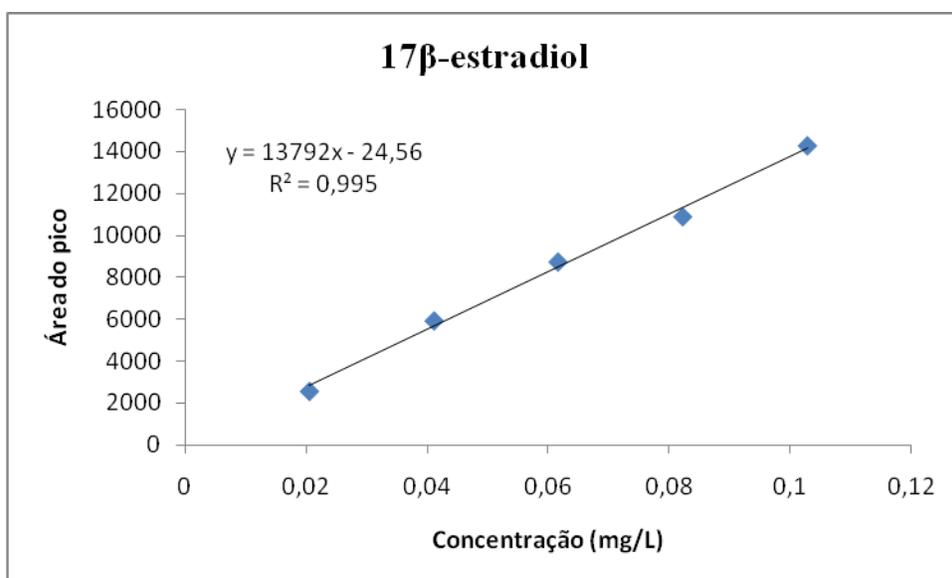
(d) 120 dias após o plantio

Anexo III

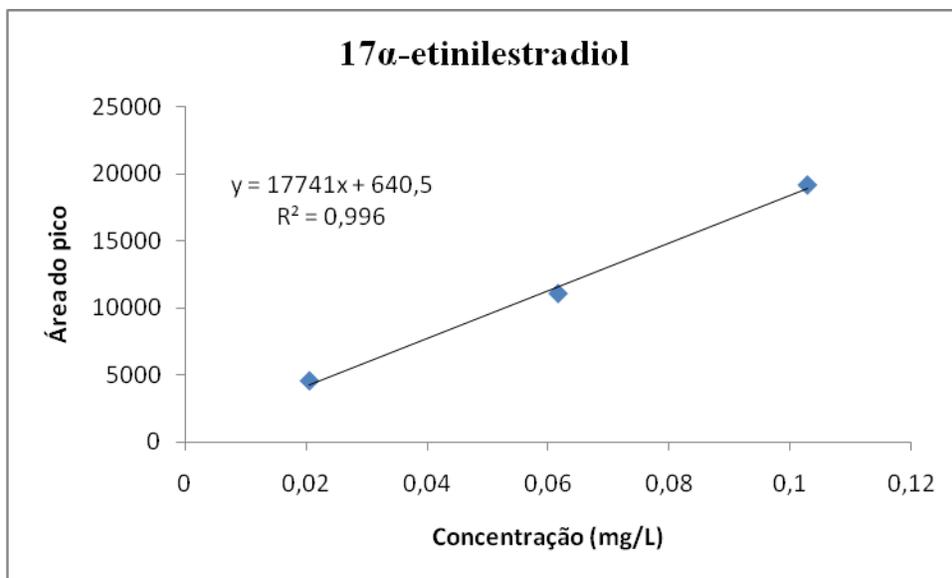
A.III - Curvas analíticas de baixa concentração dos hormônios estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2)



(a)



(b)

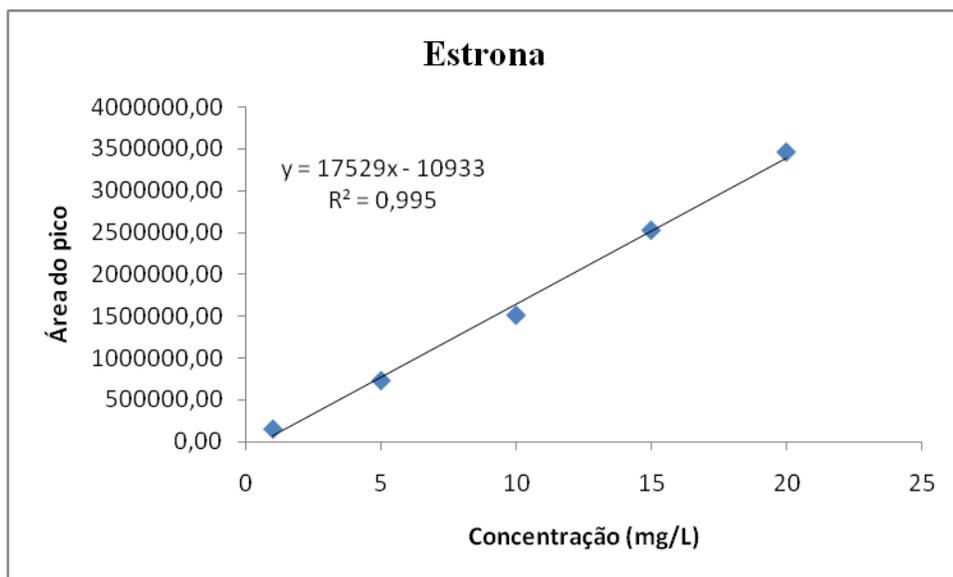


(c)

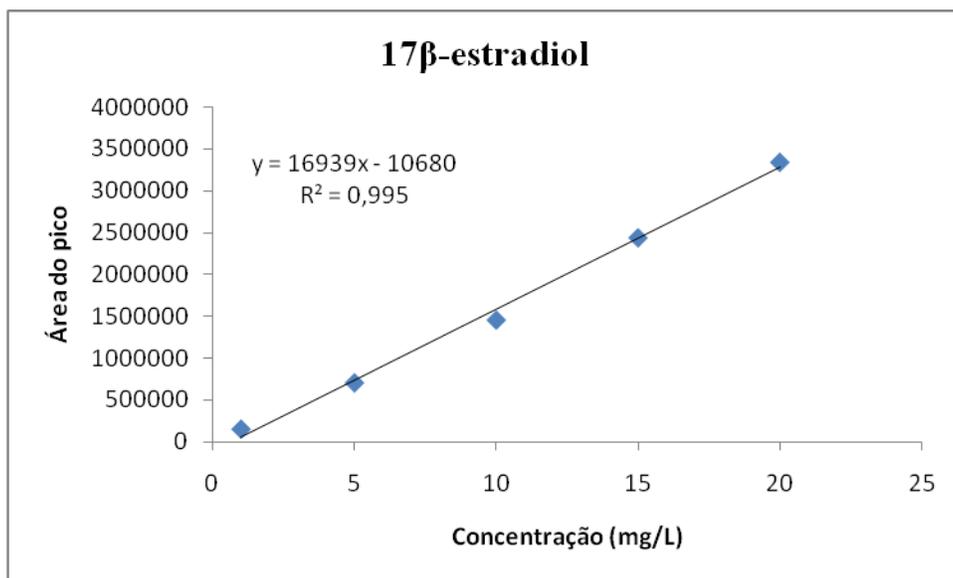
Figura A.III - Curva analítica dos hormônios (a) estrona, (b) 17 β -estradiol (E2) e (c) 17 α - etinilestradiol (EE2)

Anexo IV

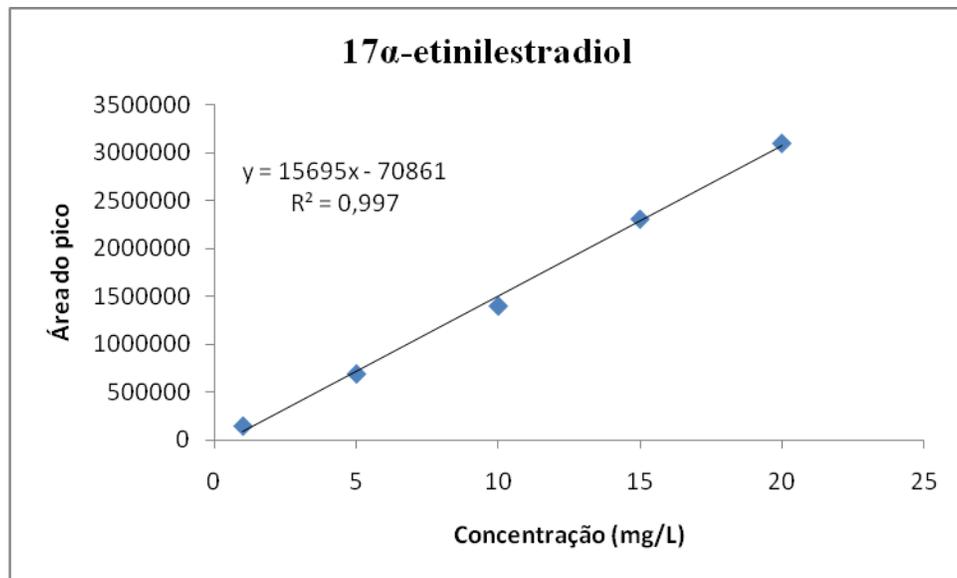
A.IV - Curvas analíticas de alta concentração dos hormônios estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2)



(a)



(b)



(c)

Figura A.IV - Curvas analíticas dos hormônios (a) estrona (E1), (b) 17 β -estradiol (E2) e (c) 17 α - etinilestradiol (EE2)

Anexo V

A.V - Concentração média de hormônios (ng.L^{-1}) nas amostras de esgotos domésticos, determinadas pelo HPLC.

a) Esgoto bruto (EB)

Campanhas	Estrona (E1)	17 β -estradiol (E2)	17 α - etinilestradiol (EE2)
1	< LD*	< LD	< LD
2	< LD	< LD	< LD
3	< LD	< LD	< LD
4	< LD	< LD	< LD
5	< LD	< LD	< LD
6	< LD	< LD	< LD
7	< LD	< LD	< LD
8	< LD	< LD	< LD
9	8,85	6,57	< LD
10	< LD	< LD	< LD
11	< LD	< LD	< LD
12	< LD	< LD	< LD

*LD = limite de detecção

b) Efluente USAB (EUASB)

Campanhas	Estrona (E1)	17 β -estradiol (E2)	17 α - etinilestradiol (EE2)
1	< LD*	< LD	< LD
2	< LD	< LD	< LD
3	< LD	< LD	< LD
4	< LD	< LD	< LD
5	< LD	< LD	< LD
6	ND**	ND	ND
7	< LD	< LD	< LD
8	< LD	< LD	< LD
9	ND	ND	ND
10	< LD	< LD	< LD
11	< LD	< LD	< LD
12	< LD	< LD	< LD

*LD = limite de detecção; **ND = Não detectado

c) Efluente da lagoa de polimento (EL)

Campanhas	Estrona (E1)	17 β -estradiol (E2)	17 α - etinilestradiol (EE2)
1	< LD	< LD	< LD
2	< LD	< LD	< LD
3	< LD	< LD	< LD
4	< LD	< LD	< LD
5	< LD	< LD	< LD
6	< LD	< LD	< LD
7	< LD	< LD	< LD
8	< LD	< LD	< LD
9	< LD	< LD	< LD
10	< LD	< LD	< LD
11	< LD	< LD	< LD
12	< LD	< LD	< LD

LD = limite de detecção