



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA CIVIL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

MARLON LEAL CABRAL MENEZES DE AMORIM

**Ocorrência de hormônios nas águas superficiais da Região
Hidrográfica do Médio Curso do Rio Paraíba.**

Campina Grande – PB

Agosto / 2016

MARLON LEAL CABRAL MENEZES DE AMORIM

OCORRÊNCIA DE HORMÔNIOS NAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO
HIDROGRÁFICA DO MÉDIO CURSO DO RIO PARAÍBA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Civil e Ambiental da Universidade Federal de
Campina Grande, em cumprimento às
exigências para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Rui de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Mônica de Amorim Coura

Campina Grande – PB

Agosto / 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

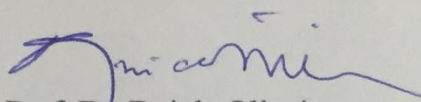
- A524o Amorim, Marlon Leal Cabral Menezes de.
Ocorrência de hormônios nas águas superficiais da região hidrográfica do médio curso do Rio Paraíba / Marlon Leal Cabral Menezes de Amorim. – Campina Grande, 2016.
70 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. Rui de Oliveira; Coorientação: Prof^ª. Dr^ª. Mônica de Amorim Coura".
1. Hormônios em Água de Abastecimento. 2. Análise de Hormônios Estrogênicos. 3. Vigilância da Contaminação de Água. I. Oliveira, Rui de. II. Coura, Mônica de Amorim. III. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande (PB). IV. Título.

CDU 556.18(043)

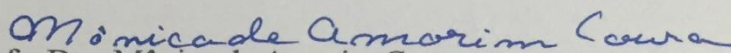
OCORRÊNCIA DE HORMÔNIOS NAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO
HIDROGRÁFICA DO MÉDIO CURSO DO RIO PARAÍBA

DISSERTAÇÃO aprovada em 26/08/2016

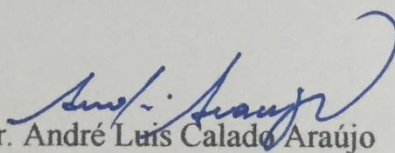
BANCA EXAMINADORA



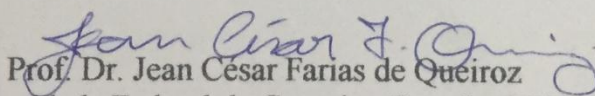
Prof. Dr. Rui de Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB
Orientador



Prof. Dra. Mônica de Amorim Coura
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG
Coorientadora



Prof. Dr. André Luis Calado Araújo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Examinador externo



Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG
Examinador Externo

DEDICATORIA

A minha esposa, Larissa Lira, minha mãe, Lúcia Leal, e meu tio Malaquias da Silva Amorim Neto (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, com quem primeiro compartilho minhas vitórias e momentos difíceis, pela graça da vida, por me dar forças para continuar lutando dia após dia, mesmo diante das adversidades.

A minha esposa Larissa Lira, pessoa especial que o Senhor colocou em minha vida, por seu companheirismo, amor, apoio e incentivo, estando sempre ao meu lado não só nessa etapa, mas em todas as situações ao longo dos últimos 8 anos.

A minha mãe, Lucia Leal, grande e maior responsável por quem sou, pelo cuidado e carinho que sempre teve por mim, e por sempre, de forma aguerrida, me apoiar.

Aos meus irmãos Mailto Junior e Mikael Leal, pelo companheirismo e cumplicidade fraterna, que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso, o amor depositado em mim é recíproco em vocês, meus grandes companheiros.

Ao meu tio Malaquias da Silva Amorim Neto, maior incentivador do conhecimento e espelho em minha vida e carreira acadêmica.

Ao mestre, orientador e amigo Rui de Oliveira, pelas caronas providas de conversas com os assuntos mais diversificados e proveitosos que serviram para o mestrado e servirão de ensinamento para toda vida, foi uma honra tê-lo como orientador.

Aos professores e orientadores Mônica de Amorim Coura, Celeide Maria Belmont Sabino Meira e Ruth Silveira do Nascimento pelas colaborações a longo desses anos.

Aos funcionários dos laboratórios de Saneamento da UFCG (Universidade Federal de Campina Grande - PB), e de Análises Farmacêuticas da UEPB (Universidade Estadual da Paraíba) pela constante disponibilidade, em especial aos amigos Paulo Cesar e Lidiane pela disponibilidade, paciência e atenção durante a obtenção dos dados do projeto.

Ao Professor Jean Queiroz pela disponibilidade e atenção na etapa inicial do trabalho.

Aos companheiros do PPGECA, especialmente aos amigos do Laio Ariel, Diego Martins e Dyego Lourenço pelas boas conversas e momentos de descontração em nossas reuniões étlicas.

Ao amigo Dayvison, companheiro das batalhas e desafios diários enfrentados desde o primeiro dia de aula do mestrado até o presente momento.

A minhas avós, Socorro e Isa, a quem sou grato pela confiança, carinho e apoio, assim como ao meu tio e todas as tias, primos e primas.

A minha sogra, Hildete Lira, por seu enorme coração, aos meus cunhados, concunhados e sobrinhos Brígida, Gabi, Marcio, Rafael, Thaise, Maria Luiza e Marcelinho.

Um agradecimento especial aos amigos sempre presentes Armando Cesar e Gustavo Lucena, pelas palavras de apoio e incentivo, principalmente, ao longo dessa caminhada.

Aos meus amigos e amigas de toda uma vida, Daniel Diniz, Kiko, Phillipy, Neto, Marina, Natália e Gabi pelo aporte nos momentos mais difíceis e dividir comigo momentos inesquecíveis.

A empresa SMC Engenharia e Soluções na pessoa do amigo Salomão Davi, pelo apoio, paciência e compreensão.

A UFCG pelo oferecimento do programa de mestrado.

Ao CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro, através da bolsa de estudos concedida para a realização desse trabalho.

À CAGEPA pela liberação para os estudos e permissão para coleta de dados.

Por fim, agradeço a todos, que de alguma forma, colaboraram para a realização e conclusão dessa dissertação.

“O conhecimento é o único bem que é impossível
lhe ser roubado, no máximo, quando em
concordância, é compartilhado. A melhor herança
que um pai pode deixar para um filho é o estudo.”

Malaquias da Silva Amorim Neto

RESUMO

Os hormônios naturais 17β -estradiol, estrona e o hormônio sintético 17α -etinilestradiol vêm sendo detectados em águas superficiais, principalmente devido ao fato dos atuais processos de tratamento de água e esgotos serem incapazes de removê-los, sendo descarregados em corpos receptores. O monitoramento da ocorrência dessas substâncias se mostra necessário, pois suas presenças podem causar danos à saúde humana e ambiental (organismos aquáticos e terrestres). No presente trabalho, foi realizado o desenvolvimento e validação do método, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector com comprimento de onda variável UV/Vis, para a determinação simultânea desses hormônios em amostras de água e esgoto da região hidrográfica do médio curso do rio Paraíba. A análise cromatográfica foi realizada em modo isocrático, fase móvel acetonitrila e água (50:50), coluna C18, vazão 1 mL/min, injeção 10 μ L, comprimento de onda de 200 nm, temperatura do equipamento de 40°C. O método desenvolvido apresentou uma boa resposta quanto à seletividade dos hormônios e linearidade com coeficiente de determinação (r^2) entre 0,9943 e 0,9951. Os limites de quantificação estimados foram de 90,45 μ g/L para o 17β -estradiol, 96,76 μ g/L para o 17α etinilestradiol e 96,19 μ g/L para a estrona, sendo os limites de detecção de, respectivamente, 60,27 μ g/L, 65,12 μ g/L e 64,16 μ g/L. A precisão e a robustez apresentaram desvios padrões relativos inferiores a 5%. A metodologia proposta mostrou-se adequada para a determinação de hormônios estrogênicos em amostras de águas. Com relação à análise nas amostras de água e esgoto coletada, não foi detectado a presença de hormônio em nenhuma das amostras nas concentrações mínimas de detecção e quantificação do método desenvolvido.

Palavras chaves: Hormônios em água de abastecimento, Análise de hormônios estrogênicos, Vigilância da contaminação de água.

ABSTRACT

The natural hormones 17β - estradiol and estrone and the synthetic hormone 17α - ethinylestradiol have been detected in surface water, mainly due to the current water and wastewater treatment processes being unable to remove them, leading them to be discharged into receiving water bodies. Monitoring the occurrence of these substances in water is currently very necessary because their presence can cause harm to human health and the environment (aquatic and terrestrial organisms). This work describes the development and validation of a method for the simultaneous determination of these hormones in water samples by means of high-performance liquid chromatography (HPLC), from the simultaneous determination of these hormones in water samples and sewage from the river basin of the middle course of the river Paraíba. The chromatographic analyses were performed in an isocratic mode, being the mobile phase acetonitrile and water (50:50), using a C18 column, flow rate of 1mL/min, 10 μ L-injection volume, wavelength of 200 nm and temperature of 40 °C. The method showed a good response on the hormone selectivity and linearity of calibration curves with coefficients of determination (r^2) between 0.9943 and 0.9951. The estimated quantification limits were 90.45 μ g/L for 17β - estradiol, 96.76 μ g/L for the 17α ethinylestradiol and 96.19 μ g/L for estrone, and the detection limits 60.27 μ g/L, 65.12 μ g/L and 64.16 μ g/L, respectively. The precision and robustness presented relative standard deviations of less than 5 %. The proposed methodology was appropriate for the determination of estrogen hormones in water samples. Regarding the analysis on water collected and sewage was nor detected the presence of the hormone in any of the samples at the minimum concentrations of detection and quantification method developed.

Keywords: Hormones in the water supply, Estrogen hormone analysis, Water contamination surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da estrona.....	24
Figura 2- Estrutura química do 17 β -estradiol.....	25
Figura 3- Estrutura química do 17 α -etinilestradiol.	26
Figura 4 - Etapas empregadas na EFS	33
Figura 5 - Sub-bacia do curso médio do Rio Paraíba.	39
Figura 6 - Representação esquemática da ETE Catingueira de Campina Grande.....	42
Figura 7 - Vista aérea da ETE Fazenda Caiçara de Campina Grande (Campina Grande - PB).	43
Figura 8 – Novo sistema de tratamento de Campina Grande	43
Figura 9 - Estação de Tratamento de Água de Gravatá de Queimadas.	44
Figura 10 - Estação de Tratamento de Água de Itatuba.	44
Figura 11 - Estação de Tratamento de Esgoto de Campina Grande.....	45
Figura 12 - Pontos de coleta de amostras da ETA Gravatá	45
Figura 13 - Pontos de coleta de amostras da ETA Itatuba.....	46
Figura 14 - Pontos de coleta de amostras da ETE Campina Grande.....	46
Figura 15 - Pré-filtração.	47
Figura 16 - Percolação das amostras.	48
Figura 17 - Processo de eluição.....	48
Figura 18 - Filtração e armazenamento.	49
Figura 19 - Cromatograma da amostra em branco.	52
Figura 20 - Cromatograma da amostra fortificada extraída de acordo com a seção 3.3	52
Figura 21 - Curva de calibração do hormônio 17 β -estradiol.....	53
Figura 22 - Curva de calibração do hormônio 17 α -etinilestradiol	54
Figura 23 - Curva de calibração do hormônio estrona	54
Figura 24 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a montante da ETE de Campina Grande.....	58
Figura 25 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a jusante da ETE de Campina Grande	58
Figura 26 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a montante da ETA de Itatuba	59
Figura 27 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a jusante da ETA de Itatuba.....	59
Figura 28 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a montante da ETA de Gravatá.....	60
Figura 29 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a jusante da ETA de Gravatá	60

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Exemplos de efeitos atribuídos aos interferentes endócrinos em animais..... 28

Tabela 1– Excreção diária ($\mu\text{g/l}$) de 17β -estradiol, estrona, estriol e 17α -etinilestradiol.	21
Tabela 2 - Equações das curvas de calibração.....	53
Tabela 3 - Limites de detecção e quantificação dos hormônios estudados.	55
Tabela 4 - Repetibilidade dos hormônios estudados	55
Tabela 5 - Médias da precisão intermediária dos hormônios estudados	56
Tabela 6 - Desvio padrão relativo (%) para diferentes proporções da fase móvel.....	56
Tabela 7 - Desvio padrão relativo (%) para a variação do comprimento de onda do detector.	57
Tabela 8 - Desvio padrão relativo (%) para diferentes temperaturas do forno do equipamento.....	57

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Agência Executiva de Gestão de Águas do Estado da Paraíba (AESA)

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

Coefficiente de Variação (CV)

Comitê Científico do Centro Latino-americano Saúde e Mulher (CELSAM)

Companhia de Água e Esgotos da Paraíba (CAGEPA)

Cromatografia Gasosa (CG)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS)

Desvio Padrão (DP)

Dispositivo Intrauterino (DIU)

Estação de Tratamento de Água (ETA)

Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

Extração da Fase Sólida (EFS)

High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (HPLC)

Inclinação da Curva (IC)

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)

Limite de Detecção (LD)

Limite de Quantificação (LQ)

Litro (L)

Micrograma (μg)

Miligrama (mg)

Mililitro (mL)

Picograma (pg)

Pró-análise (PA)

Tempo de Detenção Hidráulica (TDH)

Ultra Violeta (UV)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Visível (Vis)

SUMÁRIO

Sumário

1.0	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Objetivo Geral.....	18
1.2	Objetivos Específicos.....	18
2.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Ocorrência de hormônios no meio ambiente	19
2.2	Uso de anticoncepcionais no Brasil	21
2.3	Classificação dos hormônios estrogênicos	23
2.4	Impacto causado no meio ambiente	26
2.5	Remoção de hormônios em estações de tratamento de água e esgoto	29
2.6	Análise de águas	32
2.6.1	Extração de hormônios em fase sólida (EFS).....	32
2.7	Validação do método analítico.....	34
2.7.1	Especificidade e seletividade.....	34
2.7.2	Linearidade	34
2.7.3	Precisão.....	35
2.7.4	Limite de detecção (LD).....	35
2.7.5	Limite de quantificação (LQ)	36
2.7.6	Exatidão	36
2.7.7	Robustez	37
3.0	METODOLOGIA.....	38
3.1	Caracterização da área de estudo	38
3.1.1	Açude Epitácio Pessoa	39
3.2	Coleta das amostras.....	43
3.3	Extração da fase sólida.....	47
3.4	Equipamento e condições cromatográficas.....	49
3.5	Preparo dos padrões utilizados.....	50
3.6	Preparo da curva de calibração	50
3.7	Validação do método	50
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	Validação do método analítico.....	52
4.1.1	Seletividade	52

4.1.2	Linearidade	53
4.1.3	Limite de detecção (LD) / Limite de Quantificação (LQ).....	54
4.1.4	Precisão e exatidão	55
4.1.5	Robustez	56
4.2	Determinação de hormônios em amostra de agua e esgoto	57
5.0	CONCLUSÕES	61
6.0	REFERÊNCIAS	62

1.0 INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais causados pelo crescimento populacional vêm se tornando uma grande preocupação, tanto para as autoridades governamentais, como para a própria sociedade. O crescimento contínuo das cidades, sem o devido controle e planejamento, agravado pelo adensamento populacional, acarreta a degradação, cada vez maior, dos recursos ambientais, entre eles a água. Dentre as alternativas existentes para frear o crescimento populacional, uma das mais incentivadas, até mesmo pelo governo, através de seus programas de incentivo à contracepção, é o uso de anticoncepcionais. Outro fator relevante que elevou o consumo desses medicamentos foi à ascensão da mulher na sociedade e sua inserção no mercado de trabalho, almejando postos mais elevados e de mais destaque, sendo a gravidez indesejada encarada como um empecilho para essa conquista.

A parcela dos hormônios, presente nos anticoncepcionais ou produzidos naturalmente pelo corpo humano, não assimilada pelo organismo é eliminada pela urina, em maior quantidade, e pelas fezes, em menor quantidade (LINTELMANN, KATAYAMA E KURIHARA, 2003), aumentando assim as concentrações de hormônios nos esgotos domésticos.

As duas principais fontes de contaminação ambiental por hormônios são o lançamento de efluentes domésticos sem tratamento ou tratados por estações de tratamento de esgoto não projetadas visando a sua remoção, e a produção e manejo animal (RAMAN *et al.*, 2004).

Dentre os hormônios contidos no esgoto doméstico estão os estrogênios, que podem ser classificados como naturais, produzidos naturalmente pelo organismo feminino, a exemplo da estrona e do 17β – estradiol, ou sintéticos, fabricados em laboratórios farmacêuticos que têm como principal finalidade a composição dos anticoncepcionais, a exemplo do 17α – etinilestradiol.

Pesquisas (REIS *et al.*, 2006; BILA E DEZOTTI, 2007; CHRISTIANSEN, *et al.*, 2002) indicam que a ingestão desses hormônios, mesmo que em pequenas quantidades, pode trazer malefícios à saúde humana e danos a animais, como por exemplo, a alteração da sexualidade de peixes, afetando a capacidade reprodutiva de suas espécies. Com relação à saúde das mulheres foram descritos casos de desenvolvimento de câncer de mama e útero (MIERZWA *et al.*, 2009; GHISELLI E

JARDIM, 2007) para os homens a ingestão de hormônios tem sido associada à ocorrência de ginecomastia, câncer de testículo, diminuição da libido e impotência sexual (SANTAMARTA, 2001; MCLACHLAN *et al.*, 2006).

O presente trabalho tem o objetivo de contribuir com a validação de um método analítico, via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e determinação simultânea de 17β – estradiol, 17α – etinilestradiol e estrona, em amostra de águas superficiais da região hidrográfica do médio curso do Rio Paraíba no estado da Paraíba, podendo auxiliar os usuários da água, as autoridades sanitárias e as empresas responsáveis pelo gerenciamento dos recursos hídricos na tomada de decisões responsáveis pelo gerenciamento dos recursos hídricos e tratamento da água destinada ao consumo humano.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral investigar a ocorrência de hormônios, nas águas superficiais do eixo Açude Epitácio Pessoa (Boqueirão) – Açude Argemiro de Figueiredo (Acauã), na região hidrográfica do médio curso do Rio Paraíba, como contribuição para as ações de vigilância da qualidade da água, particularmente o desenvolvimento de sistema sentinela para a prevenção de danos à saúde e ao meio ambiente, relacionados a essas substâncias.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinação e validação de um método analítico via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para a determinação simultânea de 17β -estradiol, 17α - etinilestradiol e estrona;
- Monitorar a ocorrência dos hormônios 17β -estradiol, estrona, 17α - etinilestradiol nas águas brutas e tratadas nas principais estações de tratamento convencionais de água da região hidrográfica do médio curso do Rio Paraíba;
- Monitorar a ocorrência dos hormônios 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol no afluente e efluente final da estação de tratamento de esgotos de Campina Grande, maior concentração urbana da região hidrográfica do médio curso do Rio Paraíba.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ocorrência de hormônios no meio ambiente

Amostras das matrizes ambientais, principalmente a água, demonstram vestígios de diferentes produtos químicos utilizados pelo homem ao longo dos anos. A água se caracteriza como um insumo indispensável e insubstituível na manutenção da vida terrestre, mas a grande diversidade de substâncias encontradas solúveis na mesma caracteriza um verdadeiro coquetel de compostos químicos, podendo causar problemas sérios aos organismos mais sensíveis e aos seres humanos que dependem dessa “água contaminada” para sobreviver.

Substâncias presentes em diversos produtos das mais diversas utilidades, como por exemplo, medicamentos, detergentes, agrotóxicos, tintas, corantes, produtos para cuidados pessoais e conservantes, podem ser classificadas como micropoluentes emergentes, os quais podem causar impactos negativos na fauna, flora e efeitos nocivos à saúde dos seres humanos (SOUZA, 2011).

O termo “micropoluentes emergentes” é empregado para um grupo especial de poluentes, que se destacam por sua crescente utilização pela população e posterior lançamento e contaminação no meio ambiente, principalmente nas águas, sendo assim, compostos em que, na atual conjuntura, podem não ser avaliados como problemáticos, mas, no futuro, podem revelar-se indesejáveis (FILHO *et al.*, 2007).

Dentro dessa vasta gama de compostos químicos perigosos estão os fármacos. Segundo Kummerer (2001), na Alemanha foram registrados em torno de 50.000 tipos diferentes de fármacos de uso humano e 90% desses contêm 900 diferentes substâncias ativas que, após serem aplicadas, são excretadas pelos pacientes chegando aos esgotos domésticos. Inseridos no grupo dos fármacos encontram-se os hormônios estrogênicos que, geralmente, são utilizados na reposição terapêutica da menopausa, contraceptivos orais ou injetáveis e na prevenção de aborto, e também fazem parte da cadeia de hormônios femininos. Bodzek e Dudziak (2006) relatam que 17 β -estradiol, estrona e estriol são estrogênios cuja detecção no meio ambiente tem aumentado de forma acentuada, atribuindo esse aumento tanto à excreção animal como, principalmente, à grande quantidade de descarga de medicamentos nos domicílios.

As duas principais fontes de contaminação de hormônios no meio são o lançamento de efluentes domésticos sem tratamento ou tratados por estações de tratamento de esgoto não projetadas visando a sua remoção, e a produção e manejo animal (RAMAN *et al.*, 2004; ZHENG, YATES E BRADFORD, 2008).

A produção e manejo animal é uma atividade de muita relevância e que emprega muita gente no Brasil e no mundo. O aumento da produção animal, alavancado pelo crescimento da população mundial eleva o impacto causado pela excreção de hormônios. A excreção fecal e urinária de bovinos e suínos varia de 0,1 a 160 mg/dia (LOPES, 2007). Larsson *et al.* (1999), revelam que a excreção de estrogênios por animais ocorre pela urina e pelas fezes e que além da produção natural de hormônios pelo organismo animal, existem também a excreção advinda da utilização de fármacos aplicados em clínicas veterinárias.

Os hormônios presentes nos efluentes domésticos são provenientes, principalmente, de excreções femininas, que contêm hormônios devido à produção e eliminação natural, e da utilização de contraceptivos que contêm em sua composição de 30 a 50 µg do hormônio sintético 17 α-etinilestradiol. Os diferentes organismos humanos eliminam diferentes quantidades de hormônios, sendo essa variação determinada pela dieta, estado de saúde, idade, estado de gestação, dentre outros fatores. A eliminação de hormônio ocorre pela urina, em maior quantidade, e pelas fezes, em menor quantidade. (LINTELMANN, KATAYAMA E KURIHARA, 2003). Em mulheres em condições normais, a taxa de produção de 17β estradiol varia durante o ciclo menstrual, desde níveis de 50 µg/L de urina no início da fase folicular, até picos de 350 -850 µg/L de urina, no pico da pré-ovulação (KASSAB, 2001). A Tabela 1 apresenta uma estimativa das taxas de excreção diária dos principais estrogênios encontrados no meio ambiente por seres humanos, demonstrando a variação desses índices de acordo com as condições e estado do corpo excretor.

Tabela 1– Excreção diária ($\mu\text{g/l}$ de urina) de 17β -estradiol, estrona, estriol e 17α -etinilestradiol.

	17 β -Estradiol ($\mu\text{g/L}$)	Estrona ($\mu\text{g/L}$)	Estriol ($\mu\text{g/L}$)	17 α - Etinilestradiol ($\mu\text{g/L}$)
Homens	1,6	3,9	1,5	-
Mulheres em Menstruação	3,5	8,0	4,8	-
Mulheres em menopausa	2,3	4,0	1,0	-
Mulheres em gestação	259	600	6000	-
Mulheres	-	-	-	35

FONTE: JOHSON, BELFROID E DI CORCIA (2000)/ YING, KOOKANA E RU (2002); JOHNSON E WILLIAMS (2004).

3.2 Uso de anticoncepcionais no Brasil

Nos tempos de colônia a organização social brasileira foi estruturada a partir do setor agrícola, necessitando-se de famílias numerosas nos latifúndios para aumentar a produção, assim como nos minifúndios para garantir a subsistência da família. No decorrer da primeira metade do Século XX foi mantida a cultura da manutenção de grandes famílias, pois fatores como a alta mortalidade infantil e baixa expectativa de vida, causadas pelas precárias condições de higiene, saúde e habitação vividas, aliadas à necessidade cada vez crescente de mão de obra para manter a força de trabalho motivavam a manutenção de tal cultura (COELHO *et al.*, 2000).

O pós-guerra no Brasil foi marcado por grande expansão industrial e, em 1953, esta já ultrapassava em 50% o crescimento da agricultura. Apesar da expansão e modernização da indústria, a distribuição de renda continuou perversa e desigual; em contraponto a mortalidade geral diminuiu, em relação às décadas anteriores, porém a natalidade continuou alta (FALEIROS, 1992). Na década de 1960 os países ricos passaram a pressionar os governos do “Terceiro Mundo” para adotar a política do

controle populacional, atribuindo à explosão populacional nos países tidos como pobres a responsabilidade pela fome, pobreza e degradação do meio ambiente (SOF, 1994).

Após uma sequência de debates, da resistência de militares e da Igreja, o Brasil cedeu à pressão externa, e, em 1962, dois anos após ter sido aprovado nos Estados Unidos, o comércio da pílula anticoncepcional e o Dispositivo Intrauterino (DIU) tiveram seu uso iniciado no Brasil (PEDRO, 2003). Não por coincidência, a década de 1960 também foi marcada pela maior inserção da mulher no mercado de trabalho e expansão da consciência feminista, existindo uma cena política de contestação cultural, facilitando a aceitação das mulheres aos métodos contraceptivos que eram divulgados como instrumentos eficazes e imprescindíveis para a liberação feminina, permitindo dissociar a sexualidade da procriação (COELHO *et al.*, 2000). Dessa forma as mulheres, principalmente de camadas médias brasileiras, aderiram ao consumo da pílula, contribuindo para um mercado em crescimento acelerado. Em 1970, 6,8 milhões de cartelas de pílulas anticoncepcionais foram vendidas e, em 1980, este número subiu para 40,9 milhões (PEDRO, 2003).

A Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde, desenvolvida em 1996, realizou um levantamento do uso de anticoncepcionais entre as mulheres que se declaravam em união estável, na faixa etária entre 15 e 49 anos; esse levantamento apontou que 76,7% das entrevistadas em todo o Brasil faziam uso de algum método contraceptivo, e, dessas 20,7% declararam utilizar pílula. O número de entrevistadas na região nordeste que afirmaram utilizar algum método contraceptivo aumentou para 78,2%, porém o percentual de mulheres que declararam utilizar pílulas foi de 12,7% (BRASIL, 1997).

O avançado desenvolvimento da indústria química, com o intuito de suprir as necessidades da sociedade, aliado ao anseio de controlar o aumento populacional é o ponto de partida para o desenvolvimento de anticoncepcionais cada vez mais eficientes. Segundo o Comitê Científico do Centro Latino-americano Saúde e Mulher – CELSAM, o Brasil encontra-se em terceiro lugar no consumo de anticoncepcionais na América Latina, atrás somente do Uruguai e do Chile (PERSHÉ, 2008).

De acordo com Fernandes (2007) o consumo de anticoncepcionais no Brasil tem aumentado consideravelmente. Projeções realizadas pelo setor industrial farmacológico, em 2006, mostram que existiam 8.000.000 de usuárias de pílulas anticoncepcionais, já considerando uma perspectiva de, nas próximas duas décadas, esse número chegar a 45.000.000.

3.3 Classificação dos hormônios estrogênicos

Os hormônios são substâncias químicas produzidas por glândulas do sistema endócrino ou por neurônios especializados; são proteínas provenientes de aminoácidos ou esteroides, que estão envolvidos na reprodução sexual de homens e de mulheres, promovendo a comunicação entre diferentes partes do organismo, agindo como mensageiros químicos (FALONE, 2007).

As células identificam os hormônios através de receptores especializados em reconhecimento molecular e, após essa fase de interação hormônio-receptor, uma série de reações bioquímicas ocorre transmitindo as respostas biológicas específicas, representando uma espécie de mecanismo de chave e fechadura em que para cada hormônio há um receptor que o reconhece, o hormônio então se encaixa para ser absorvido e agir no local específico (SIMMONDS, 1992, VEDRAMI, 1998).

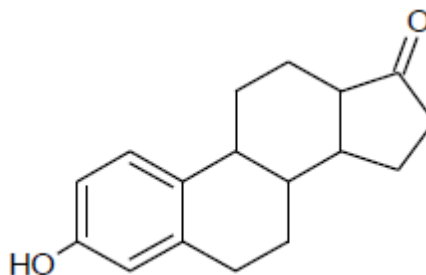
Estrogênios são hormônios sexuais femininos, produzidos pelos ovários e liberados na primeira fase do ciclo menstrual, responsáveis pelo desenvolvimento das características femininas no início da puberdade, agindo sobre as células, anatomia e comportamento. Agem no controle da ovulação, no desenvolvimento e preparo cíclico do sistema reprodutor para a fertilização e implantação do óvulo, no aumento das glândulas mamárias durante a gravidez, estimulam o crescimento dos tecidos ao promover a proliferação celular nos órgãos sexuais femininos (seios e útero), além de exercerem influência sobre o crescimento e desenvolvimento (NASSIF *et al.*, 2005; CHAMPE *et al.* 2006). Atuam também nos sistemas imunológico e cardiovascular, além de influir na pele, nos ossos, no fígado e mesmo no cérebro, assegurando a normalidade nos sistemas orgânicos (RAIMUNDO, 2007).

Os hormônios podem ser classificados com relação à sua natureza, como naturais e sintéticos. Entre os hormônios naturais estão a estrona e o estradiol.

A estrona (Figura 1) é um hormônio estrogênico derivado da androstenediona, secretado pelo ovário e pelo tecido adiposo, sendo o menos abundante dos hormônios abordados. É notável por se tratar de um agente cancerígeno para mulheres, bem como causador de cólicas, sensibilidade mamária, náusea, hipertensão, dores de cabeça e nas pernas. Durante a menopausa, a estrona é o estrogênio predominante e, após essa fase, continua a ser sintetizado em menor quantidade (<35 pg/mL). É produzido através da conversão do esteroide adrenal, principalmente nos tecidos gordurosos e células

musculares; quanto maior o teor de gordura, mais estrona é produzida (CHEMSPIDER, 2016). A estrona está presente na urina de mulheres grávidas, em alguns animais e até em algumas plantas (referência?). Alguns tratamentos usando irradiação com luz UV indicam que o tempo de meia vida na fotodegradação é de 2 a 3 horas em água de rio, o que sugere que ele possa ser susceptível à fotólise direta pelo sol (GOODMAN GILMAN, 2005; TOXNET, 2016).

Figura 1- Estrutura química da estrona

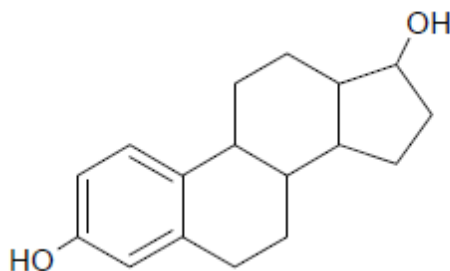


Fonte: DIAS, 2014.

O 17 β -estradiol (Figura 2) é um hormônio sexual da classe dos esteroides, produzido pelos folículos ovarianos, cerca de 10 vezes mais potente que a estrona em fêmeas em idade reprodutiva. Esse hormônio também está presente nos machos, sendo produzido como um metabólito ativo de testosterona, com níveis séricos variando de 14 a 55 pg/mL.

O estradiol afeta na reconstituição óssea e manutenção dos tecidos do organismo, garantindo a elasticidade da pele e dos vasos sanguíneos, além de causar impacto sobre as funções sexuais e reprodutivas como o desenvolvimento das características sexuais secundárias (GOODMAN GILMAN, 2005; CHEMSPIDER, 2016). O hormônio em questão também é utilizado na terapia de reposição hormonal, durante a menopausa, por apresentar inúmeras vantagens no controle dos sintomas, aumentando a lubrificação vaginal, a libido feminina e o bem-estar psíquico. Também é indicado no tratamento de hipoestrogenismo, no tratamento de câncer de mama e de próstata. Apesar disso, também é classificado como composto carcinogênico para humanos de acordo com Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) (TOXNET, 2016).

Figura 2- Estrutura química do 17 β -estradiol.



Fonte: DIAS, 2014.

Já com relação aos hormônios estrogênicos sintéticos, o 17 α -etinilestradiol é o hormônio monitorado nesta pesquisa (Figura 3) e assim como os hormônios naturais, é excretado pelo organismo. O 17 α -etinilestradiol foi desenvolvido na década de 1920, a partir do 17 β -estradiol, principal estrogênio endógeno nos seres humanos e um composto bioativo utilizado em formulações combinadas com progesterona de pílulas anticoncepcionais orais, porém sua comercialização se iniciou somente na década de 1960, na forma de pílulas anticoncepcionais.

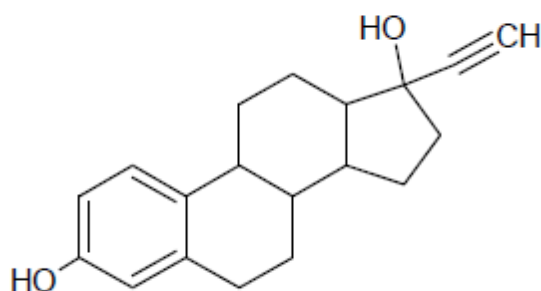
Atualmente, a ação de contraceptivos é totalmente conhecida: são absorvidos pelas células do sistema reprodutivo, osso, fígado e outros tecidos que se ligam aos receptores de estrogênio e progesterona. Através da corrente sanguínea interferem nos ovários, dificultando a fecundação, por impedir a liberação do óvulo, promover um menor espessamento do endométrio (impedindo a implantação do embrião) ou secretar muco que dificulta a chegada de espermatozoides ao óvulo (CHEMSPIDER, 2016).

Foram desenvolvidos 32 tipos de pílulas contraceptivas que são rotineiramente ingeridas por mais de 100 milhões de mulheres no mundo. Apesar de ser amplamente utilizado para contracepção, o 17 α -etinilestradiol é um risco na formação de coágulos, tromboembolia venosa e câncer de endométrio. Após sua absorção no organismo, seu metabolismo é realizado no sistema hepático e é excretado no meio ambiente como um xenoestrógeno na urina e fezes de mulheres que fazem uso contínuo de medicamentos que contenham este composto (CHEMSPIDER, 2016).

Apesar de ainda não serem conhecidas quais as concentrações e os efeitos que o 17 α -etinilestradiol pode causar quando presente no ambiente, esse composto tem sido considerado de risco por alguns órgãos competentes. Em 2004, a Agência Ambiental da

Inglaterra e País de Gales considerou que havia evidências suficientes para incluí-lo na lista de compostos utilizados para gestão de riscos. A Comissão Europeia (2012) considerou-o como substância prioritária na Diretiva que protege e conserva corpos d'água europeus; mas essa decisão e a que se refere a outros microcontaminantes emergentes foi adiada para 2016 com o objetivo de que houvesse mais estudos sobre o tema (DIAS, 2014).

Figura 3- Estrutura química do 17 α -etinilestradiol.



Fonte: DIAS, 2014.

Os hormônios estrogênicos, em geral, se degradam rapidamente no solo e na água, tendo uma baixa pressão de vapor, sendo classificados como compostos orgânicos hidrofóbicos de baixa volatilidade. Os estrogênios naturais 17 β -estradiol e estriol têm solubilidade aproximada de 13 mg/L já o estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol tem solubilidade de 4,8 mg/L; com base nessas informações espera-se que a sorção no solo ou no sedimento possa ser um fato significativo para a redução das concentrações na fase aquosa (YING *et al*, 2002).

3.4 Impacto causado no meio ambiente

Os hormônios são uma parte essencial tanto da medicina moderna humana quanto da veterinária e, apesar de já terem sido submetidos a estudos farmacocinéticos e aprovados pelo governo, existe ainda uma considerável falta de conhecimento sobre o seu destino no ambiente. Estes compostos químicos, muitas vezes, apresentam propriedades físico-químicas persistentes, são lipofílicos, bioacumulativos e têm baixa pressão de vapor, facilitando a sua dispersão no meio ambiente (TORRES, 2009).

Os hormônios estrogênicos sintéticos e naturais são substâncias classificadas também como disruptores endócrinos. A United States Environmental Protection Agency (US-EPA 1997) descreve um disruptor endócrino como um “agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que é responsável pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos”.

Disruptores endócrinos são substâncias químicas capazes de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino dos seres humanos ou animais, sendo substâncias responsáveis por dois fenômenos identificados como agonista e antagonista. No fenômeno identificado como antagonista os disruptores endócrinos agem reduzindo ou anulando os estímulos de certas partes do organismo, através do bloqueio dos receptores específicos de um determinado hormônio, já no efeito denominado de agonista, os disruptores endócrinos imitam a ação dos hormônios levando o organismo a desencadear, de modo exagerado ou em tempo inapropriado, um estímulo falso. (GHISELLI, 2007; BIBBO *et al.*, 1978; JOLLY *et al.*, 2006; COLUCCI, BORK E TOPP, 2001).

Os hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol recebem uma maior atenção por serem produzidos e lançados na rede de esgoto de forma contínua, em maiores quantidades, e não serem completamente removidos nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE's), podendo, assim, serem encontrados na água superficial destinada ao consumo humano e animal (BILA, DEZOTTI, 2007). Embora essas substâncias presentes no esgoto, apresentem baixas concentrações, atingem os mananciais e a água potável em níveis acima de 1ng/L (17α -etinilestradiol) e de 10ng/L (estrona e 17β -estradiol), doses mínimas capazes de apresentar efeito tóxico à biota aquática e ao ser humano (HEISTERKAMP, GANDRASS E RUCK, 2004; BECK *et al.*, 2005; BAREL-COHEN *et al.*, 2006).

A presença de hormônios no meio ambiente pode afetar de forma negativa a população de animais expostos, sendo as mais diversas e indeterminadas as consequências causadas. Dentre os impactos causados, devido à presença destes hormônios de forma indesejada, pode-se citar a interferência na capacidade de reprodução das espécies e influência no desenvolvimento da prole, feminilização de peixes machos, provocando o hermafroditismo em peixes, pássaros, répteis e

mamíferos, diminuindo a eclosão de ovos de tartarugas, pássaros e peixes e causando alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos (SANTAMARTA, 2001; MCLACHLAN *et al.*, 2006; REIS FILHO *et al.*, 2006). No Quadro 1 estão descritos alguns microcontaminantes e seus principais efeitos nos animais.

Quadro 1. Exemplos de efeitos atribuídos aos interferentes endócrinos em animais.

Classe	Contaminante	Efeito	Referências
Peixes	Efluente de ETE	Feminilização de peixes; declínio da reprodução; aumento na síntese de vitelogenina (VTG).	Robinson <i>et al.</i> (2003); Sole <i>et al.</i> (2000, 2003)
	Estradiol	Feminilização de peixes; declínio da reprodução; aumento na síntese de VTG; alteração nas gônadas; hermafroditismo; incidência de testículo-óvulos nas gônadas; mortalidade elevada da prole.	Knorr e Braunbeck (2002); Panter, Thompson e Sumpter (2000); Routledge <i>et al.</i> (1998); Shioda e Wakabayashi (2000)
	Etinilestradiol	Declínio da reprodução; indução da síntese de VTG; mortalidade da espécie.	Robinson <i>et al.</i> (2003); Schmidt <i>et al.</i> (2002)
	Estrona	Indução da síntese de VTG	Routledge <i>et al.</i> (1998)
Répteis	Estradiol	Indução da síntese de VTG; alterações na produção de ovos.	Irwin, Gray e Oberdorster (2001)
Anfíbios	Efluente de ETE	Indução da síntese de VTG; hermafroditismo.	Bogi <i>et al.</i> (2003)

Fonte: Mierzwa *et al.*, 2009.

Um dos primeiros casos registrados de efeitos de interferentes endócrinos na saúde humana foi associado ao dietilbestrol que, a partir de 1938, começou a ser usado para evitar abortos espontâneos e somente nas décadas de 1970 e 1980 foi comprovado que este medicamento causava distúrbios nos sistemas reprodutores masculino e feminino com anomalias congênitas e câncer. Além disso, foi o primeiro fármaco que causou câncer vaginal em filhas quando ingerido pelas mães (CARLSON, 1962).

Estudos relatam que a exposição a disruptores endócrinos durante o desenvolvimento fetal e durante a primeira infância, mesmo em doses baixas, da ordem de micro a nanogramas por litro, pode provocar danos que não seriam observados em adultos, como redução da capacidade mental e má-formação genital. Há uma crescente preocupação de que a exposição crônica a interferentes endócrinos ambientais possa contribuir para a ocorrência de puberdade precoce em seres humanos (DIAS, 2014).

A exposição de mulheres a agentes estrogênicos é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de útero e mama, intervenção no crescimento mamário, lactação e predisposição ao desenvolvimento de doenças uterinas como fibroses e endometriose (GHISELLI, 2007; CHRISTIANSEN *et al.*, 2002; BILA, DEZOTTI, 2007). A ação dos estrógenos nos homens pode resultar em ginecomastia, impotência, diminuição da libido, diminuição dos níveis de hormônio masculino (andrógeno) no sangue, diminuição na contagem de espermatozoides, testículos não descendidos (criptorquidia), pênis sumariamente pequenos, além de hipospádia, um efeito no qual a uretra não se prolonga (SANTAMARTA, 2001; MCLACHLAN *et al.*, 2006; REIS FILHO *et al.*, 2006; GHISELLI, 2007; PONEZI *et al.*, 2006 *apud* MACHADO, 2010).

Frente à realidade da produção, ingestão, excreção e lançamento de hormônios no meio ambiente através, principalmente, do esgoto doméstico, aliado aos efeitos nocivos descritos, fica clara a necessidade e importância do monitoramento dos mesmos em matrizes ambientais.

3.5 Remoção de hormônios em estações de tratamento de água e esgoto

Em estações de tratamento de água (ETA) ou estações de tratamento de esgoto (ETE), presume-se que técnicas de separação mecânica, como a sedimentação, possa promover a remoção dos hormônios, pois o principal destino dos hormônios em corpos hídricos a sorção no solo e sólidos em suspensão (Ying *et al.* 2002), trazendo por

consequência o enriquecimento do lodo de esgoto com estas substâncias. Entretanto, os hormônios apresentam características físico-químicas que favorecem a sua permanência no efluente final, podendo não haver remoção significativa destes compostos nas ETE's (RAIMUNDO, 2007; ARNON *et al.*, 2008).

As ETE convencionais, em grande parte, os principais mecanismos de remoção de compostos orgânicos são (1) a adsorção em sólidos suspensos, (2) a associação dos compostos com ácidos graxos e óleos, (3) a biodegradação aeróbica ou anaeróbica, (4) a degradação química por processos de hidrólise e (5) a volatilização (RAIMUNDO, 2007).

Em tratamento biológico de esgoto, o pré-tratamento ocorre por meio do uso de grades e telas para a remoção de grandes objetos, não favorecendo a remoção dos hormônios, pois uma quantidade significativa de material orgânico persiste dissolvida e em suspensão (KHANAL *et al.*, 2006).

Já no tratamento primário, ocorre a remoção de sólidos orgânicos por gravidade. Os hormônios são separados da fase aquosa por sedimentação e/ou flotação e durante a separação de óleos e graxas, sendo incorporados ao lodo primário. A remoção destes compostos depende de três fatores: quantidade de lodo primário, coeficiente de partição dos hormônios entre a fase aquosa e o lodo primário e o tempo de detenção hidráulica (TDH). Quanto menor o TDH, menor a eficiência na remoção (KHANAL *et al.*, 2006).

No tratamento secundário, os hormônios são removidos da fase aquosa por adsorção aos flocos ou biofilmes, onde são mais eficientemente degradados por microrganismos. Dos diversos tipos de tratamentos convencionais, os tratamentos que têm demonstrado maior eficiência na remoção de hormônios são lodos ativados e filtração biológica, primeiro e segundo mais eficazes, respectivamente (TERNES *et al.*, 1999; JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000; KHANAL *et al.*, 2006).

A adsorção é um processo físico de remoção que pode ocorrer naturalmente no ambiente ou em processos usuais de tratamento de esgotos (lodos ativados ou materiais adsorventes) através da adsorção de hormônios presentes na fase aquosa a uma fase sólida. Durante a adsorção, a remoção pode ser afetada por alguns parâmetros como tamanho de partícula, carbono orgânico total, pH, temperatura, salinidade e competição por outros íons ou compostos. Hormônios possuem a tendência à adsorção e a utilização

de materiais adsorventes se mostra uma boa alternativa para sua remoção. Um exemplo desses materiais é o carvão ativado o qual, devido às suas propriedades, mostra-se eficaz na remoção de vários poluentes orgânicos e inorgânicos e pode ser empregado em processos de tratamento de água para consumo humano. Há também outros materiais que podem ser utilizados, como quitina, quitosano, resina de troca iônica derivada de carbono e polímeros à base de esteroides (SILVA *et al.*, 2012).

Alguns estudos relatam a influência de diversos fatores na eficiência de remoção dos hormônios por lodos ativados tais como: o tempo de detenção hidráulica, carga orgânica, temperatura e composição dos flocos formados (quantidade de nutrientes e características hidrofóbicas) (TERNES *et al.*, 1999; JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000). Para Khanal *et al.* (2006), o motivo da maior eficiência do sistema de lodos ativados se deve à nitrificação. Bactérias nitrificantes têm se mostrado eficientes na remoção de hormônios, porém exigem um longo período de tratamento. De acordo com Andersen *et al.* (2003), a remoção de hormônios ocorre com tempo de detenção hidráulica acima de 4 dias, mas obtém alta eficiência de remoção (em torno de 90%) com TDH de 11 a 13 dias.

Em relação ao sistema anaeróbio, os resultados obtidos têm apresentado menor eficiência na remoção de hormônios, comparados aos de sistemas aeróbios (LEE E LIU, 2002; SERVOS *et al.*, 2005; LOPES, 2007).

Outras técnicas de tratamento podem melhorar a eficiência das ETE na remoção de hormônios tais como ozonização, radiação ultravioleta, membranas de filtração e carvão ativado (ANDERSEN *et al.*, 2003). Nghiem *et al.* (2009) obtiveram retenções de 80 a 90% dos hormônios pesquisados, por nanofiltração. Ohko *et al.* (2002) degradaram 99% de 17 β -estradiol por fotocatalise com TiO₂ e radiação ultravioleta, após 30 min. Khanal *et al.* (2006) obtiveram remoção em torno de 90% de 17 β -estradiol por adsorção em carvão ativado e Shappell *et al.* (2008) degradaram 80% de estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol por catálise com peróxido de hidrogênio.

Na fase sólida a biodegradação dos hormônios também é mais eficiente e mais rápida em meio aeróbio (KHANAL *et al.*, 2006). Em tratamento por digestão anaeróbia de lodo, Carballa *et al.* (2007) obtiveram remoções de 50% a 95% de estrogênios, sendo a remoção, provavelmente, ligada à condição anaeróbia. Para Joss *et al.* (2004), a

degradação dos estrogênios está intimamente ligada ao potencial redox e é diferente para condições aeróbia, anaeróbia e anóxica.

No Brasil a grande maioria de ETA tem o tratamento do tipo convencional, que tem se mostrado pouco eficiente com relação à remoção de hormônios. As etapas do tratamento convencional são basicamente a coagulação, floculação, decantação e filtração. Em linhas gerais, esse tipo de tratamento consiste, inicialmente, na coagulação da água bruta, geralmente com um sal de alumínio ou ferro na qual ocorre a formação de precipitados entre o metal coagulante e partículas presentes na água. Na floculação, a material coagulada é submetida à agitação lenta durante o tempo necessário para que os flocos alcancem tamanho e peso suficientes para que sejam removidos nas etapas posteriores, por sedimentação (nos decantadores) ou por flotação (nos flotadores). Na etapa final, a água passa por unidades de filtração contendo materiais com granulometria apropriada, geralmente areia ou uma mistura de antracito e areia. (DIAS, 2014).

3.6 Análise de águas

Devido aos baixos níveis de contaminação, com baixos valores de concentração a serem detectados, e complexidade da matriz ambiental a ser analisada, faz-se necessária a utilização de métodos com alta sensibilidade para análise de hormônios estrogênios (WANG *et al.*, 2008). Os métodos que podem ser utilizados para tal análise são, cromatografia em fase gasosa com espectrômetro de massas, detecção eletroquímica com por fluorescência, espectrometria de massa e cromatografia líquida com detecção ultravioleta (TORRES, 2009).

Levando em consideração a complexidade e alto custo de métodos, como por exemplo, cromatografia com espectro de massa, a cromatografia líquida com detecção ultravioleta é uma boa opção para a análise de hormônios em água, porém faz-se necessário que a amostra, antes, seja submetida a um tratamento, conhecido como extração em fase sólida (TORRES, 2009).

3.6.1 Extração de hormônios em fase sólida (EFS)

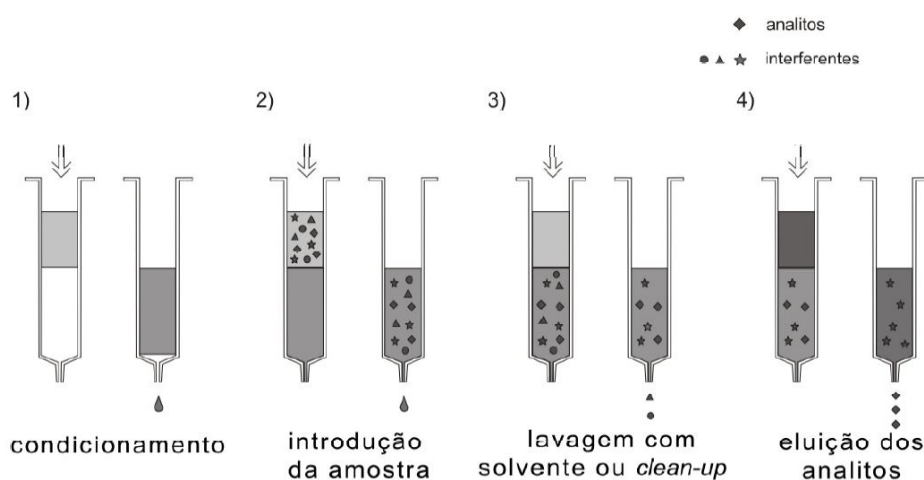
Os principais objetivos da EFS são a remoção de interferentes da matriz, concentração e isolamento dos analitos; as fases sólidas ou solventes empregados são similares às utilizadas na cromatografia, conseqüentemente, os mecanismos de

separação são similares. A EFS, na sua forma mais comum, emprega fases sólidas também denominadas de sorventes, que recheiam cartuchos de polipropileno nas formas de barril ou seringa; as amostras são colocados no topo do cartucho e aspiradas com pequeno vácuo de forma a penetrar o cartucho (JARDIM, 2010).

Os procedimentos de extração em fase sólida compreendem as seguintes quatro etapas, também representadas esquematicamente na Figura 4:

1. Condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra;
2. Introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e, às vezes, de alguns interferentes;
3. Limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*;
4. Eluição do analito.

Figura 4 - Etapas empregadas na EFS



Fonte: JARDIM, 2010.

Em geral, a EFS pode ser usada para três importantes propósitos: extração e/ou concentração do analito, isolamento da matriz e estocagem da amostra. Assim, o primeiro propósito refere-se aos analitos que ficam retidos na FS para posterior eluição, e o segundo, aos que são eluídos diretamente, enquanto as substâncias interferentes ficam retidas, sendo que, neste caso, tem-se o *clean-up* da amostra e não a concentração do analito (JARDIM, 2010).

3.7 Validação do método analítico

A Resolução 899/2003 da ANVISA define validação como a garantia de que o método atende às exigências das aplicações analíticas por meio de estudos experimentais, assegurando a confiabilidade dos resultados, indicando como parâmetros experimentais para a validação a especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e robustez. Já de acordo com o documento do Inmetro CGCRE-008 de 2007, os parâmetros utilizados no processo de validação são: especificidade e seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez.

3.7.1 Especificidade e seletividade

Capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, RDC 899/2003).

3.7.2 Linearidade

Corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (analito). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. (ANVISA, RDC 899/2003). A linearidade é determinada pelo coeficiente de determinação (r^2), obtido pelo gráfico relacionado à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito (VAZ et al., 2007).

Para estimar os coeficientes de uma curva analítica, pode-se usar um método de regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b (Equação 1), também pode ser estimado, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação R. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

$$y = a + bx \quad (1)$$

sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica ou sensibilidade.

3.7.3 Precisão

Avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, RDC 899/2003).

A precisão pode ser medida através de:

- Repetibilidade - concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação;
- Precisão intermediária - concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;
- Reprodutibilidade - concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, em estudos colaborativos.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (ANVISA, RDC 899/2003; INMETRO, 2011), como mostra a Equação 2:

$$DPR = CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

DP = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada.

3.7.4 Limite de detecção (LD)

Menor quantidade de um analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ANVISA, RS 899/2003):

Quando utilizados métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela Equação 3 (ANVISA, RS 899/2003):

$$LD = \frac{DPa}{IC} \times 3 \quad (3)$$

Na qual:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração;

IC = inclinação da curva de calibração.

3.7.5 Limite de quantificação (LQ)

Menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela Equação 4 (ANVISA, RDC 899/2003):

$$LD = \frac{DPa}{IC} \times 10 \quad (4)$$

Na qual:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração;

IC = inclinação da curva de calibração.

3.7.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média

determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme representado na Equação 5 (ANVISA, RDC 899/2003):

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100\% \quad (5)$$

3.7.7 Robustez

Trata-se da capacidade de um método resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos indicando a influência dessas variações no resultado final, ou seja, essa avaliação permite identificar quais as fragilidades do método, permitindo ajustes que venham a manter sua qualidade (ANVISA, RDC 899/2003).

Os parâmetros avaliados na cromatografia líquida são:

- Variação do pH da fase móvel;
- Variação na composição da fase móvel;
- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas;
- Temperatura; e
- Fluxo da fase móvel.

4.0 METODOLOGIA

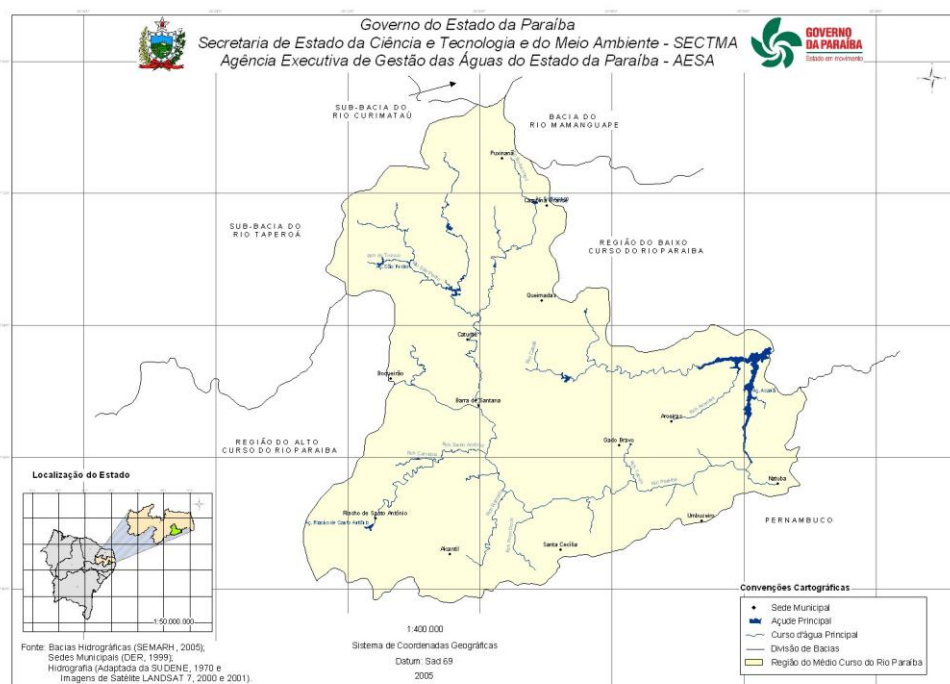
4.1 Caracterização da área de estudo

A área estudada é a região hidrográfica do médio curso do Rio Paraíba, localizada ao sul do planalto da Borborema, como ilustrado na Figura 5, com área de 3.760,65 km² (AESAs, 2015), abrangendo os municípios de Alcantil, Aroeiras, Barra de Santana, Barra de São Miguel, Boqueirão, Campina Grande, Caturité, Fagundes, Gado Bravo, Itatuba, Natuba, Pocinhos, Puxinanã, Queimadas, Riacho de Santo Antônio, Santa Cecília e Umbuzeiro.

Com relação ao clima da área de estudo, de acordo com a classificação de Köppen, o clima predominante é semiárido quente, com precipitação anual entre 600 e 1.100 mm, umidade relativa anual média do ar entre 68% a 85% e temperaturas médias anuais mínimas de 18°C a 22°C e máximas entre 28°C e 31°C.

A população urbana e rural da área de estudo é de respectivamente 430.600 e 99.163 habitantes, de acordo com o Censo 2010 (BRASIL, 2015), dentre os municípios abrangidos, a cidade de Campina Grande o principal aglomerado urbano. Com relação as fontes superficiais de água, o açude Epitácio Pessoa (Boqueirão), a montante, e o açude Argemiro de Figueiredo (Acauã), a jusante, são os principais mananciais da região, em que a principal destinação da água é o abastecimento humano, agricultura e dessedentação animal. Ambos os corpos aquáticos são classificados pela SUDEMA (Superintendência de Administração do Meio Ambiente) na Classe II, de acordo com seus usos preponderantes seguindo as orientações da Diretriz DZS 205 de 1988.

Figura 5 - Sub-bacia do médio curso do Rio Paraíba.



Fonte: AESA, 2007.

4.1.1 Açude Epitácio Pessoa

O açude Epitácio Pessoa, popularmente conhecido como açude de Boqueirão, foi construído entre os anos de 1953 e 1956, por meio do barramento dos rios Paraíba e Taperoá pelo DNOCS. Com espelho d'água cobrindo uma área de 2.680 há e banhando os municípios de Boqueirão, Cabaceiras e Barra de São Miguel, o açude está localizado na mesorregião da Borborema, especificamente na microrregião do Cariri Oriental paraibano, distante 165 km da capital do estado, João Pessoa, e a 44 km de Campina Grande. De acordo a AESA (2015) o reservatório apresenta atualmente uma capacidade máxima de armazenamento de 411.686.287 m³. A evaporação média do açude é de 1800 mm/ano e a temperatura média é de 27 °C (MEDEIROS *et al.*, 2015).

Medeiros *et al.* (2015) expõe que o manancial abastece aproximadamente 23 municípios, atendendo a uma população estimada de 900.000 habitantes, sendo a Companhia de Água e Esgotos da Paraíba (CAGEPA) o principal usuário, que estima uma retirada total de água bruta do açude em 1,5 m³/s. De acordo com Leal (2012) a principal estação de tratamento de água que recebe e trata as águas do açude Boqueirão é a ETA Gravatá, recebendo 1,3m³/s de água.

Situada no município de Queimadas, a ETA Gravatá é do tipo convencional e tem capacidade para tratar 1,5 m³/s, sendo constituída por uma calha *parshall*, floculadores mecânicos, decantadores de fluxo horizontal, filtros de gravidade, tanque de contato de cloro e casa de química completa (MENESES, 2011).

A água, assim que chega à ETA, passa por um tanque de tranquilização para que ocorra uma redução da velocidade de escoamento, em seguida segue para uma calha *Parshall* (mistura rápida), onde recebe a adição do coagulante (sulfato de alumínio) e da cal, depois segue para 24 floculadores mecânicos de eixos verticais, tipo paleta, com volume total de 1.341,20 m³. Em seguida, a água floculada é destinada aos decantadores de escoamento horizontal, tipo convencional, que somam uma área de 6.730 m². Então, a água decantada passa por 11 filtros rápidos de dupla camada, totalizando uma área de 475 m². Na etapa final do tratamento (desinfecção), a água recebe a adição de cloro gasoso em câmaras de contato que somam um volume de 4.000 m³ (LEAL, 2012).

4.1.2 Açude Argemiro de Figueiredo

O açude Argemiro de Figueiredo, popularmente conhecido como açude de Acauã, foi construído entre os anos de 1999 e 2002 através do barramento dos rios Paraíba e Paraibinha. , a bacia hidráulica do açude tem extensão de 2.300ha, abrangendo os municípios de Itatuba, Natuba e Aroeiras (LUNA, 2008), o reservatório apresenta uma capacidade máxima de armazenamento em torno de 253.000.000 m³ a (AESAs, 2015). O principal intuito da construção do açude foi de reforçar o sistema de abastecimento da cidade de Campina Grande, contribuir com o suprimento de água de 17 cidades do Planalto da Borborema, e, também, contribuir com a irrigação do Baixo Vale do Paraíba, criação de polo pesqueiro e funcionar como barreira de contenção de possíveis enchentes (GUERRA, 2012; LUNA, 2008).

Hoje a principal finalidade da água retirada do reservatório é o abastecimento humano, a Cagepa de Itatuba está licenciada à retirar 227,34 m³/h de água e a Cagepa Aroeiras 108 m³/h por meio de outorga, segundo a AESA (2015), além do abastecimento humano o Consórcio Acauã tem a licença de uso de 90 m³/h com finalidades industriais. Duas ETA tratam as águas captadas pela Cagepa do açude de Acauã, a ETA Itatuba, no município de Itatuba, e a ETA localizada nas proximidades da comunidade de Pedro Novo Velho, no município de Aroeiras (GUERRA, 2012).

A ETA Itatuba tem o tratamento caracterizado do tipo convencional e, de acordo com Guerra (2012), a estação apresenta vazão afluente da ordem de 60 L/s, utilizando

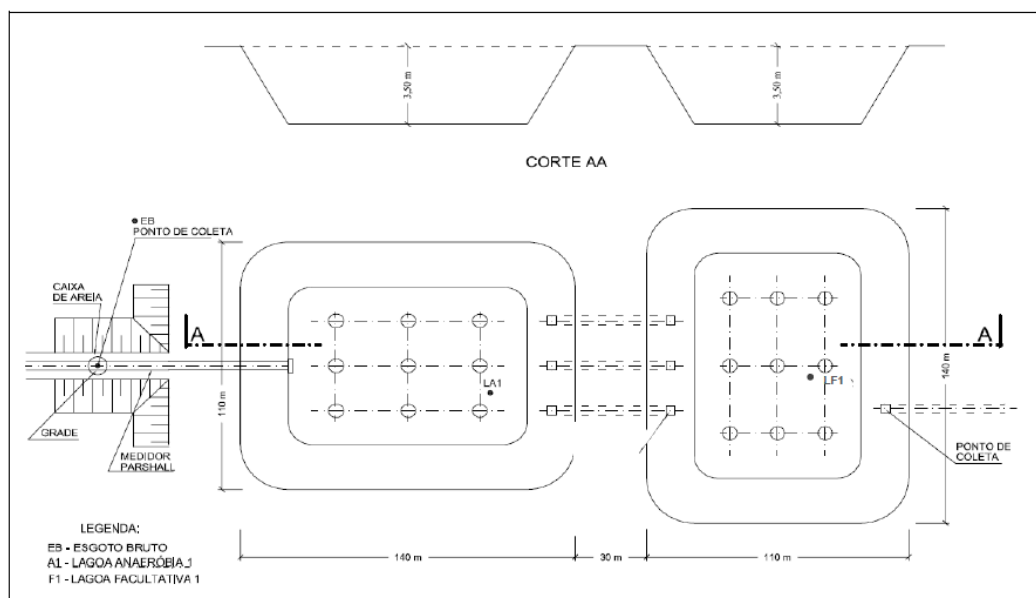
processo de pré-oxidação e desinfecção com cloro gasoso, já o coagulante é o sulfato de alumínio. A ETA de Itatuba abastece os municípios de Itatuba, Ingá, Joarez Távora e Zumbi, totalizando uma população de aproximadamente 27 mil habitantes com demanda diária estimada em 58 L/s.

4.1.3 Estação de tratamento de esgoto de Campina Grande

A cidade de Campina Grande, situada no Agreste Paraibano, localizada a 120 km da capital do estado, João Pessoa, se caracteriza como uma cidade de médio porte com uma população um pouco maior que 385 mil habitantes, de acordo com o Censo 2010, sendo considerada um dos principais polos industriais e tecnológicos da Região Nordeste e maior aglomerado urbano da área de estudo.

Em 1940, Campina Grande já era beneficiada com rede coletora de esgotos e uma ETE. A instalação de uma nova ETE foi proposta em 1969, devido ao crescimento do município no que se refere ao processo de urbanização e industrialização. A ETE foi, inicialmente, projetada para funcionar com aeração mecânica, porém o sistema de aeração foi logo desativado, sendo o sistema constituído de pré-tratamento (grade, caixa de areia e medidor de vazão - calha *Parshall*) e tratamento biológico (duas lagoas em série: uma lagoa anaeróbia e uma facultativa). A forma das lagoas, de 3,5 m de profundidade útil, é retangular, com vértices arredondados, os taludes são revestidos por pedras e o coroamento constituído pela associação de terra e brita (Figura 6). A ETE encontra-se localizada no bairro da Catingueira, Zona Sudoeste da cidade, por esse motivo ficou conhecida como ETE Catingueira (PASSOS, 2011).

Figura 6 - Representação esquemática da ETE Catingueira de Campina Grande.



Fonte: Adaptado de Florentino (1993).

Em agosto de 2012 foi concluída a construção da estação elevatória de esgotos que recalca o efluente tratado na ETE Catingueira para a segunda fase da estação de tratamento de esgoto de Campina Grande, denominada ETE Fazenda Caiçara (Figura 7).

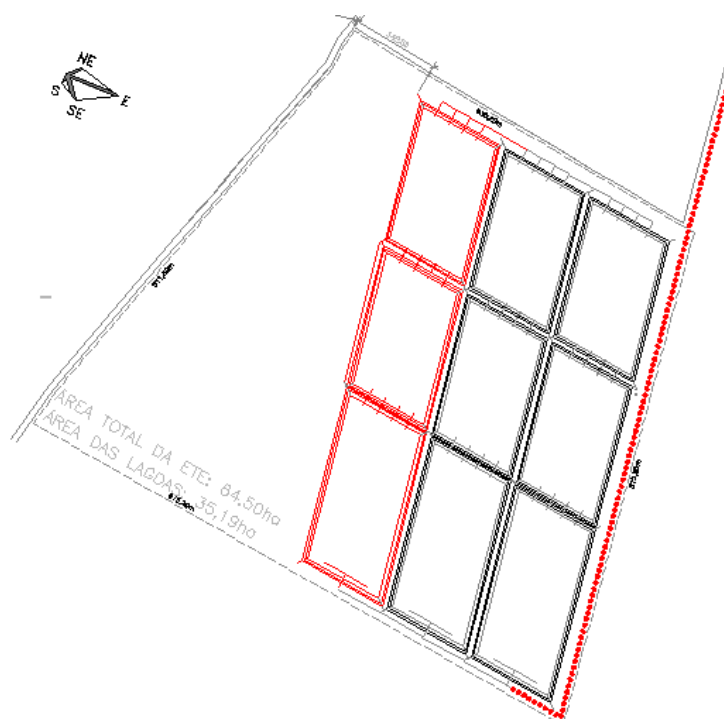
Essa segunda fase do sistema de tratamento é composta por dois módulos em série (Figura 8), cada módulo possuindo duas lagoas facultativas e uma de polimento, com capacidade de tratar a vazão de 643,70 L/s. É previsto em projeto a construção de um terceiro módulo, mas a demanda ainda não se fez necessário para implantação do mesmo, ficando o último módulo para uma etapa posterior. (CAGEPA, 2007).

Figura 7 - Vista aérea da ETE Fazenda Caiçara de Campina Grande (Campina Grande - PB).



Fonte: Google maps (2016).

Figura 8 – Novo sistema de tratamento de Campina Grande



Fonte: CAGEPA (2012).

4.2 Coleta das amostras

A amostragem para a pesquisa foi realizada a cada três semanas entre os meses de julho e outubro de 2015, ao longo do período de estiagem, sendo coletadas amostras

de água bruta e tratada das estações de tratamento de água de Gravatá (Figura 9) e de Itatuba (Figura 10), e ainda, amostras de afluentes e efluentes das estações de tratamento de esgoto (ETE) Catingueira e Caiçara, de Campina Grande (Figura 11).

Figura 9 - Estação de Tratamento de Água de Gravatá de Queimadas.



Fonte: Arquivo da pesquisa

Figura 10 - Estação de Tratamento de Água de Itatuba.



Fonte: Arquivo da pesquisa

Figura 11 - Estação de Tratamento de Esgoto de Campina Grande.



Fonte: Google maps (2016).

As amostras foram coletadas na entrada (afluente) e na saída (efluente) de cada ETA e da ETE, como ilustrado nas Figuras 12, 13 e 14. As amostras coletadas do afluente representam a água e esgoto bruto, assim como as amostras coletadas do efluente representam amostras de água e esgoto tratados em cada equipamento, permitindo a verificação do impacto das unidades de tratamento sobre os princípios ativos de hormônios.

Figura 12 - Pontos de coleta de amostras da ETA Gravatá



Fonte: Arquivo da pesquisa

Figura 13 - Pontos de coleta de amostras da ETA Itatuba



Fonte: Arquivo da pesquisa

Figura 14 - Pontos de coleta de amostras da ETE Campina Grande



Fonte: Arquivo da pesquisa

A coleta das amostras foi realizada em recipientes com capacidade de 1,5 L e transportadas para o Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) para dar continuidade as etapas subsequentes.

4.3 Extração em fase sólida

Os hormônios estudados são encontrados em níveis de traço no meio ambiente, para tanto foi realizado o processo de extração em fase sólida (EFS), com auxílio de coluna de extração com cadeia carbônica C18 (Empore™C18-SD, 10mm x 6mL - 4315SD), pois é um método que permite a identificação do objeto de estudo com eficiência. O processo de concentração das amostras foi realizado no Laboratório de Saneamento na Universidade Federal de Campina Grande, para posterior quantificação no Laboratório de Análises Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba.

As amostras foram concentradas na proporção de 1000 mL para 5mL.

O processo de extração e concentração das amostras consistiu nas seguintes etapas:

- 1- Primeiramente as amostras foram submetidas a uma filtração (Figura 15) a vácuo em papel de filtro de fibra de vidro, com porosidade de 0,6 µm com o intuito de remover os sólidos suspensos;

Figura 15 - Filtração.



Fonte: Arquivo da pesquisa

- 2- Após a filtração, com o auxílio de um sistema a vácuo, o filtrado foi submetido a uma coluna de extração com cadeia carbônica C18 (Empore™C18-SD, 10mm x 6mL - 4315SD), com o objetivo de reter os analitos;

Figura 16 - Percolação das amostras.



Fonte: Arquivo da pesquisa

- 3- Em seguida, ainda por meio do sistema a vácuo, foi feita a passagem de 5 mL do solvente orgânico Metanol P.A., grau HPLC (Sigma Aldrich®), através da coluna de extração promovendo a eluição dos analitos (Figura 17) retidos na coluna de extração, retornando-os para a fase líquida;

Figura 17 - Processo de eluição.



Fonte: Arquivo da pesquisa

- 4- Finalmente, o volume percolado foi coletado, com o auxílio de seringas hipodérmicas estéreis, e passava-se por filtros seringas (Acrodisc® 13mmsyringefilter, 0,2 μm nylon membrane) para posterior

armazenamento em tubos cônicos em polipropileno com capacidade de 1,5 mL (Figura 18). Armazenava-se um volume de 3 mL para cada amostra;

Figura 18 - Filtração e armazenamento.



Fonte: Arquivo da pesquisa

Os tubos eppendorf foram envolvidos em papel alumínio e armazenados a uma temperatura de -20°C , até o momento da quantificação no Laboratório de Análises Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Para a realização do transporte, as amostras foram acondicionadas em um recipiente com vedação térmica contendo gelo, até a chegada ao laboratório.

4.4 Equipamento e condições cromatográficas

Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu (CLUE), equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-AHT, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de onda variável UV/Vis, modelo SPD-20A, controlador CBM-20A e integrador automático computadorizado com software LC Solution[®]. A fase estacionária foi constituída por uma coluna C18 Phenomenex (*d.i.* 250 mm x 4,6 mm, 5,0 μm). A fase móvel que forneceu melhor seletividade ao método foi constituída de uma mistura isocrática de acetonitrila : água (50:50, v/v). As análises foram realizadas em temperatura controlada (40°C), utilizando um fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 μL e comprimento de onda de 200 nm.

4.5 Preparo dos padrões utilizados

Os padrões analíticos utilizados foram de 17 β -estradiol , estrona, 17 α -etinilestradiol, adquiridos à Sigma Aldrich®. Como solventes foram empregados metanol PA grau HPLC (Sigma Aldrich®) e água purificada deionizada por osmose reversa.

Para o preparo das soluções estoque dos padrões de hormônio na concentração de 0,1 mg/ml, foram pesados em balança analítica 1 mg de cada um dos três padrões, grau analítico, e transferidos para três balões volumétricos de 10 mL, cada padrão em um balão, que posteriormente foram aferidos com uma solução metanol:água (50:50, v/v), dissolvendo os hormônios.

4.6 Preparo da curva de calibração

A partir das soluções estoque do padrão foi preparada uma solução padrão mix de trabalho. Primeiramente mediram-se 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μ L de cada padrão, transferindo-se para um balões volumétricos de 10 mL, posteriormente foi adicionada a fase móvel (metanol:água - 50:50, v/v) até a aferição do balão, diluindo os padrões e obtendo-se, assim, soluções padrões mix de trabalho com concentrações de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 μ g/L de cada hormônio.

Essas soluções foram utilizadas para a construção de curvas de calibração do método.

4.7 Validação do método

A metodologia de validação foi realizada com base nos seguintes critérios, estabelecidos na Resolução 899/2003 da Anvisa.

- ✓ Seletividade – avaliada através da comparação de cromatogramas das soluções padrões e amostras em branco com a finalidade de observar possíveis interferentes;
- ✓ Linearidade – testada através da correlação entre o sinal (área do pico cromatográfico) e as concentrações das soluções padrões dos hormônios estudados, por meio da aplicação do método dos mínimos quadrados;
- ✓ Limites de quantificação e detecção – foram determinados através do método baseado em parâmetros das curvas analíticas levando em consideração o intervalo de confiança da regressão linear para o nível de significância de 5%;

- ✓ Precisão e exatidão – avaliadas por meio da estimativa do desvio padrão relativo de cada hormônio, com base na repetibilidade e precisão intermediária;
- ✓ Robustez – determinada através dos desvios padrões relativos de cada hormônio, com base na alteração do comprimento de onda, temperatura do forno e proporção da fase móvel.

Todos os parâmetros utilizados na validação do método foram estimados com o auxílio da planilha de validação eletrônica, de acordo com o trabalho de Ribeiro *et al.* (2008).

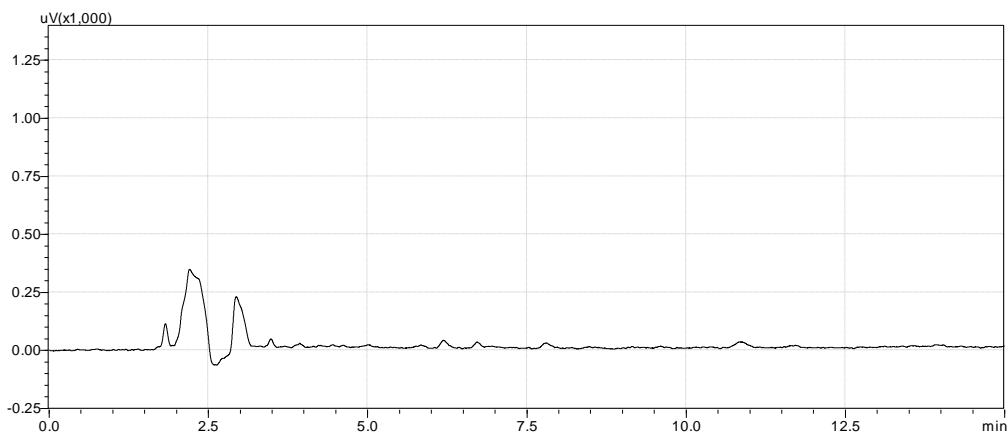
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método analítico

5.1.1 Seletividade

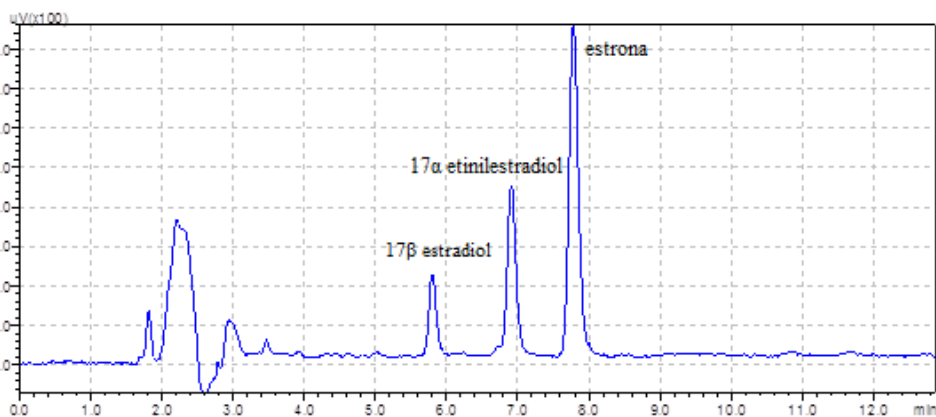
As Figuras 19 e 20 ilustram, respectivamente, os cromatogramas desenvolvidos para uma amostra em branco e para uma amostra com adição dos padrões dos hormônios estudados, sendo obtidos os respectivos tempos de retenção de 5,89, 7,00 e 7,88 minutos para 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona, os quais são tempos bastante curtos comparados aos resultados obtidos por Almeida e Nogueira (2006), em pesquisa desenvolvida para os mesmos hormônios, cujos tempos variaram entre 23,50 e 26,04 minutos. Como pode ser verificado, na Figura 20, a separação cromatográfica obtida é eficiente, com ausência de ruído na linha de para todos os analitos.

Figura 19 - Cromatograma da amostra em branco.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 20 - Cromatograma da amostra fortificada extraída de acordo com a Seção 4.3



Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.2 Linearidade

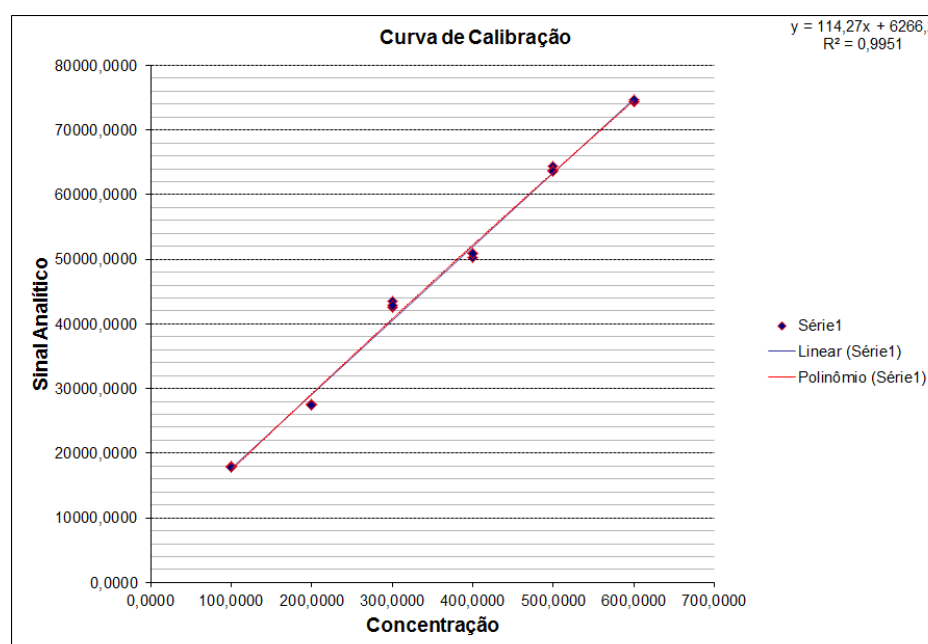
Foram utilizados seis pontos de injeção, em triplicata, referentes aos padrões 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µg/L, para a construção da curva de calibração referente a cada um dos hormônios analisados, cujas equações e respectivos coeficientes de determinação (r^2) são apresentados na Tabela 2. As curvas apresentaram perfil linear, conforme ilustrado nas Figuras 21, 22 e 23. As curvas analíticas apresentaram relação linear satisfatória, com todos os valores dos coeficientes de determinação (r^2) superiores aos valores referenciais recomendados de 0,99 e 0,90, respectivamente, pela ANVISA (2003) e INMETRO (2011).

Tabela 2 - Equações das curvas de calibração.

Hormônio	r^2	Equação linear da curva
17 β -estradiol	0,9951	$y = 114,27x + 6266,2$
17 α -etinilestradiol	0,9943	$y = 582,42x + 19337$
Estrona	0,9943	$y = 322,76x + 683,44$

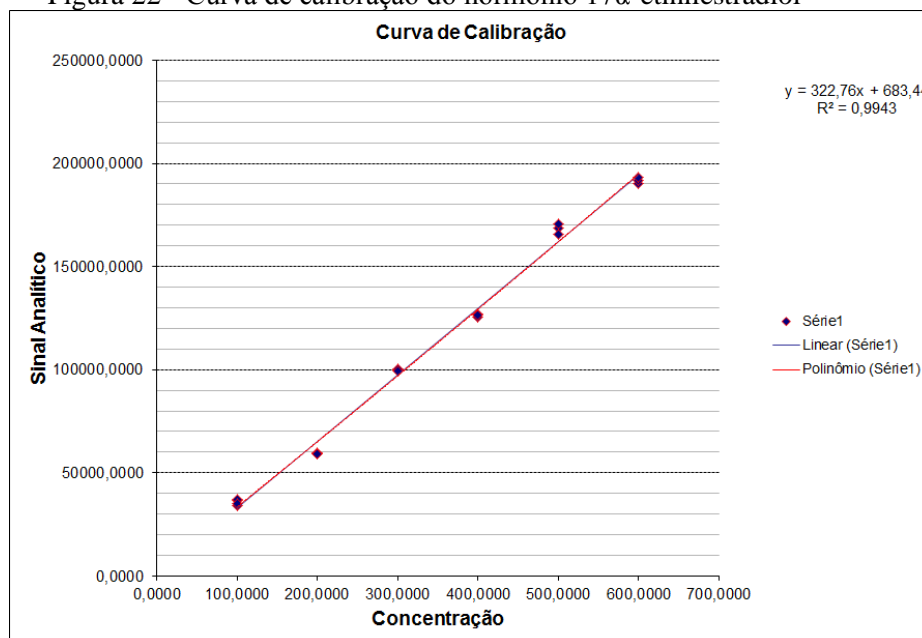
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 21 - Curva de calibração do hormônio 17 β -estradiol



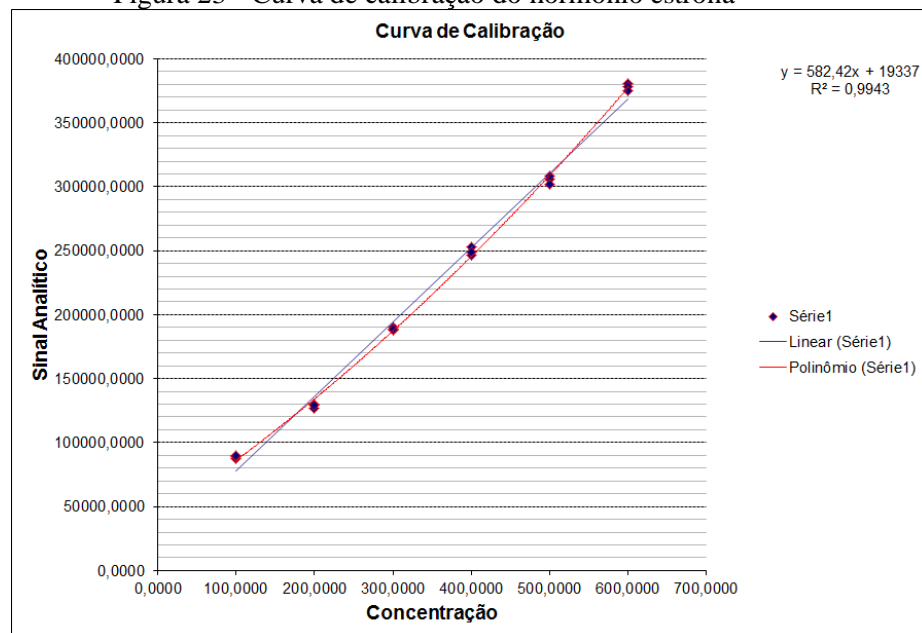
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 22 - Curva de calibração do hormônio 17 α -etinilestradiol



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 23 - Curva de calibração do hormônio estrona



Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.3 Limite de detecção (LD) / Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), para cada um dos hormônios estudados, foram determinados com a injeção, em triplicata, da concentração mediana (300 $\mu\text{g/L}$) da respectiva curva de calibração. Os valores obtidos (Tabela 3) respeitaram a significância estatística de 5,0%, conforme critério estabelecido pela ANVISA (2003).

Os limites de detecção e quantificação encontrados estão na mesma faixa pesquisada por Almeida e Nogueira (2006), entre 50 e 300 µg/L, para os hormônios aqui estudados.

Tabela 3 - Limites de detecção e quantificação dos hormônios estudados.

Hormônio	Limite de detecção de 5,0% (µg/L ⁻¹)	Limite de quantificação de 5,0% (µg/L)
17β-estradiol	60,28	90,45
17α-etinilestradiol	65,12	96,77
estrone	64,17	96,19

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas através da repetibilidade e precisão intermediária do método. Para avaliar a repetibilidade do método cromatográfico, um mesmo analista injetou seis vezes uma amostra do padrão de concentração mediana (300 µg/L) da curva de calibração, de cada um dos três hormônios estudados, nas mesmas condições de operação e no mesmo dia, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Repetibilidade dos hormônios estudados

Hormônio	Injeção	Concentração referência (µg/L)	Concentração recuperada (µg/L)	Exatidão (%)	Desvio padrão relativo (%)
17β estradiol	1	300	323,00	107,66	0,81
	2	300	321,81	107,27	
	3	300	322,59	107,53	
	4	300	323,55	107,85	
	5	300	319,39	106,46	
	6	300	327,43	109,14	
17α etinilestradiol	1	300	335,68	111,89	1,87
	2	300	328,54	109,51	
	3	300	327,60	109,20	
	4	300	321,29	107,09	
	5	300	333,22	111,07	
	6	300	320,51	106,83	
Estrone	1	300	274,800	91,51	0,89
	2	300	276,700	92,23	
	3	300	279,500	93,17	
	4	300	281,700	93,90	
	5	300	276,500	92,16	
	6	300	278,800	92,94	

Fonte: Dados da pesquisa.

Para avaliar a precisão intermediária do método cromatográfico, foram preparadas, por dois analistas diferentes, três soluções nas concentrações 100, 300 e 600 µg/L, para o 17β-estradiol e o 17α-etinilestradiol, e de 100, 300 e 500 µg/L para a

estrona, resultando, assim, seis soluções de cada hormônio a serem injetadas em triplicata no equipamento, nas mesmas condições de operação e no mesmo dia. Os resultados médios de concentrações recuperadas e desvios padrões relativos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Médias da precisão intermediária dos hormônios estudados

Hormônio	Concentração referência ($\mu\text{g/L}$)	Concentração média recuperada ($\mu\text{g/L}$)	Desvio padrão relativo (%)
17 β -estradiol	100	99,13	1,12
	300	323,33	0,37
	600	622,55	4,95
17 α -etinilestradiol	100	111,51	0,86
	300	330,15	2,25
	600	585,31	1,77
estrona	100	96,61	2,08
	300	278,00	0,89
	500	520,15	4,75

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária confirmam que os métodos são adequados, pois, para todos os princípios ativos estudados, os desvios padrões relativos se situaram abaixo de 5%, atendendo ao critério de aceitação estabelecido pela ANVISA (2003).

5.1.5 Robustez

Para determinar a robustez foi injetada, em triplicata, uma amostra do padrão de concentração mediana (300 $\mu\text{g/L}$), de cada hormônio estudado, em condições de operação alteradas. Essas condições foram a proporção da fase móvel, o comprimento de onda do detector e a temperatura do forno, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Desvio padrão relativo (%) para diferentes proporções da fase móvel

Hormônio	Proporção da fase móvel (%)		
	48	50	52
17 β -estradiol	0,45	0,68	0,83
17 α -etinilestradiol	1,41	0,56	0,77
estrona	0,44	0,66	4,95

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 7 - Desvio padrão relativo (%) para a variação do comprimento de onda do detector.

Hormônio	Comprimento de onda do detector (nm)		
	195	200	205
17 β -estradiol	2,07	0,68	1,32
17 α -etinilestradiol	0,19	0,56	0,53
estrone	1,02	0,66	2,30

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 8 - Desvio padrão relativo (%) para diferentes temperaturas do forno do equipamento.

Hormônio	Temperatura do forno ($^{\circ}$ C)		
	38	40	42
17 β -estradiol	0,88	0,68	0,59
17 α -etinilestradiol	0,70	0,56	0,08
estrone	0,85	0,66	0,34

Fonte: Dados da pesquisa.

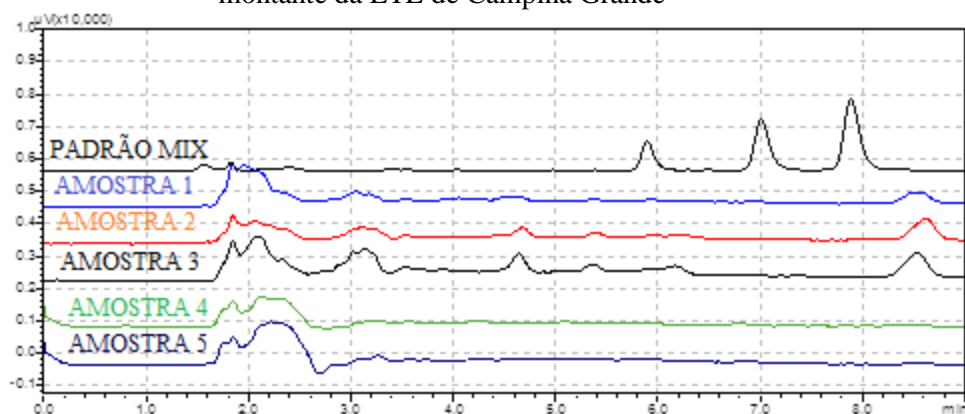
As variações dos parâmetros comprimento de onda do detector, fase móvel e temperatura do forno, não alteraram de forma significativa os valores dos desvios padrões relativos, demonstrando que o método cromatográfico utilizado é robusto.

5.2 Determinação de hormônios em amostra de água e esgoto

Após a coleta das amostras e extração da fase sólida foram realizadas as análises para detectar a presença, ou não, de hormônios nos pontos estudados.

A Figura 24 ilustra o cromatograma obtido a partir da análise de hormônios das amostras coletadas na entrada da ETE de Campina Grande, o qual não acusou presença de nenhum dos três hormônios estudados em nenhuma das amostras coletadas nas concentrações mínimas de detecção e quantificação do método desenvolvido. Esperava-se constatar a ocorrência de hormônios em concentrações significativas, principalmente, para as amostras coletadas na ETE, pois trata-se do esgoto bruto gerado na cidade de Campina Grande – PB. Gomes (2013), em pesquisa desenvolvida a respeito do esgoto de Campina Grande, concluiu que 97% dos esgotos gerados na cidade estão sendo desviados de seu tratamento planejado, quer seja por falta de manutenção do sistema, ligações clandestinas de esgoto nas redes pluviais ou pelo desvio de esgoto bruto para irrigação de culturas, podendo situações como essa ter contribuído para a qualidade do esgoto coletado e não obtenção dos resultados positivos acerca da presença de hormônios nas amostras.

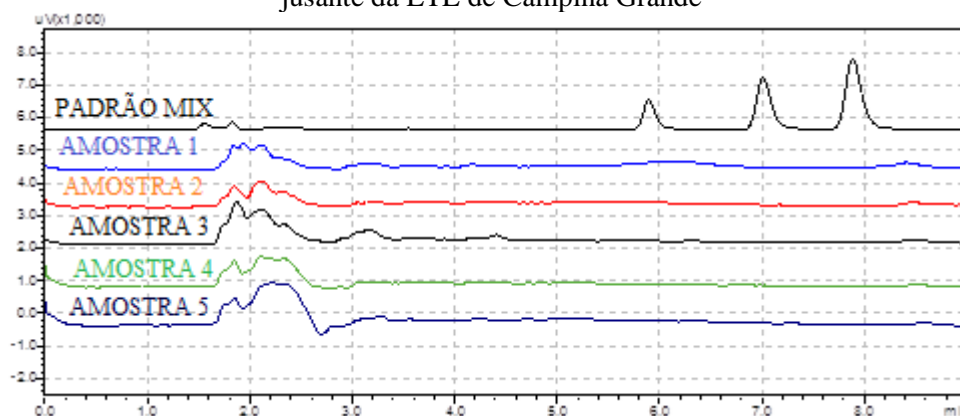
Figura 24 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a montante da ETE de Campina Grande



Fonte: Dados da pesquisa.

As análises referentes às amostras coletadas a jusante da ETE também responderam negativamente para a presença de hormônios nas concentrações mínimas de detecção e quantificação do método desenvolvido, como mostra a Figura 25.

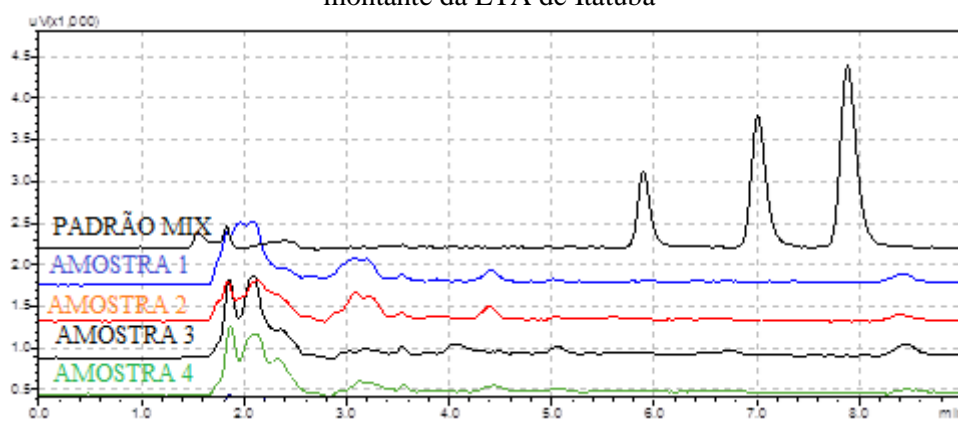
Figura 25 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a jusante da ETE de Campina Grande



Fonte: Dados da pesquisa.

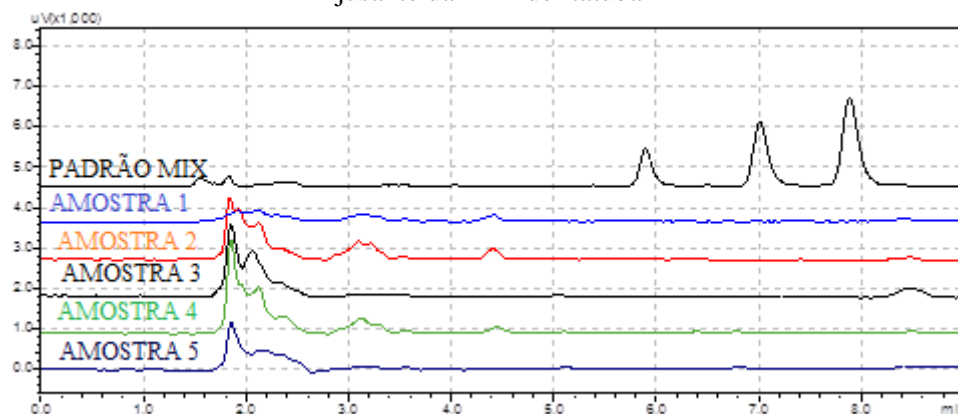
Com relação às análises das amostras de água do açude de Acauã, coletadas a montante e a jusante da ETA de Itatuba, não foi constatada a presença de hormônios na faixa de detecção e quantificação do método desenvolvido em nenhuma das amostras, como ilustram as Figuras 26 e 27. Geograficamente o açude de Acauã está situado a jusante da cidade de Campina Grande, dessa forma os esgotos tratados pela ETE da cidade se reuniram às águas escoadas na área de contribuição da bacia hidrográfica para abastecer o açude. A ausência de hormônios nas amostras coletadas na ETE justifica a, também, ausência de hormônios nas concentrações mínimas detectadas pelo método nas águas do açude de Acauã, devido ao fato de que a principal contribuição de esgotos domésticos da região é a cidade de Campina Grande.

Figura 26 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a montante da ETA de Itatuba



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 27 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a jusante da ETA de Itatuba

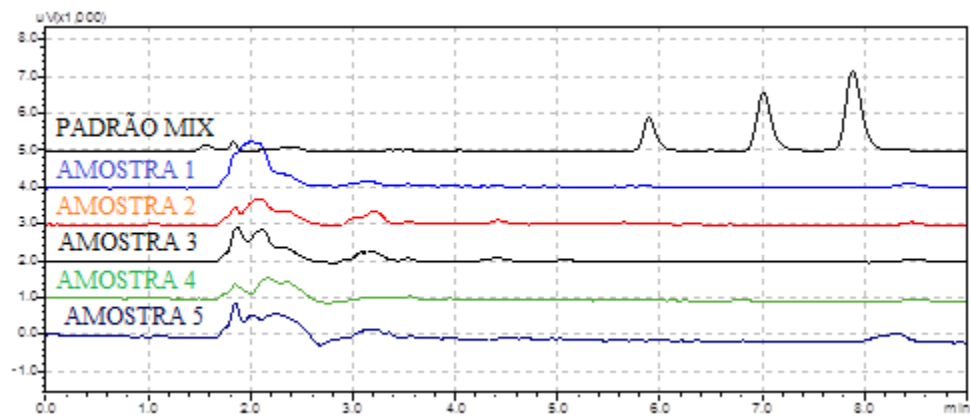


Fonte: Dados da pesquisa.

Nas análises das amostras de água do açude de Boqueirão, coletadas a montante e a jusante da ETA de Gravatá, também não foi constatada a presença de hormônios na faixa de detecção e quantificação do método desenvolvido em nenhuma das amostras como ilustram as Figuras 28 e 29. O resultado obtido estava dentro do esperado, pois a contribuição de esgoto a montante do reservatório é baixa.

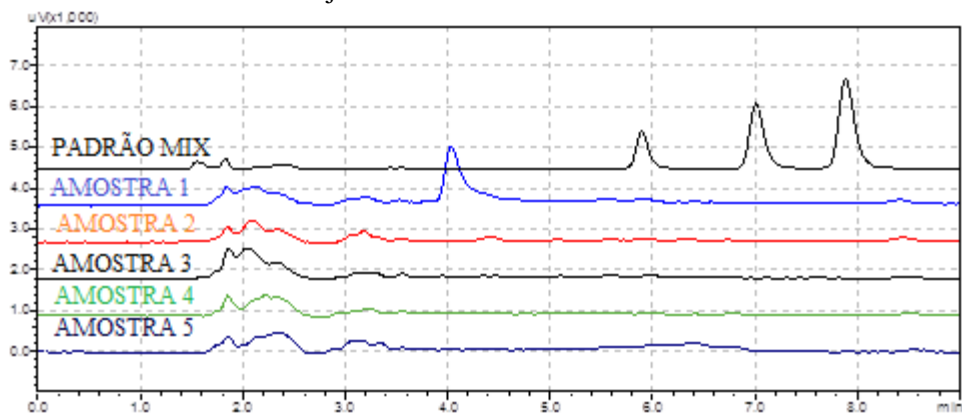
Ying *et al.* (2002) descreveram que os hormônios estrogênicos, em geral, se degradam rapidamente no solo e na água, tendo uma baixa pressão de vapor, sendo classificados como compostos orgânicos hidrofóbicos de baixa volatilidade.

Figura 28 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a montante da ETA de Gravatá.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 29 - Cromatograma das análises do padrão mix de hormônios e de amostras coletadas a jusante da ETA de Gravatá



Fonte: Dados da pesquisa.

6.0 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho é possível concluir que, a validação da metodologia proposta para análise dos hormônios estrogênicos 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol e estrona apresentou resultados satisfatórios, tendo os parâmetros seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, robustez, precisão e exatidão, atendido aos critérios de confiabilidade estabelecidos pela ANVISA e Inmetro.

Com relação às análises de hormônios, é possível afirmar que em nenhuma das amostras analisadas foi detectada sua presença, sendo as águas da região hidrográfica do médio curso do Rio Paraíba, nos pontos de amostragem, isentas de hormônios em concentrações compatíveis com os limites de detecção e quantificação pelo método desenvolvido. Não foi possível avaliar a eficiência de remoção de hormônios nas ETA's e na ETE.

7.0 REFERÊNCIAS

AESA - Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. Disponível em:<www.aesa.pb.gov.br>. Acesso em Fevereiro de 2015.

ALMEIDA, C; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Lisboa, v. 41, p. 1203-1211, 2006.

ANDERSEN, H.; SIEGRIST, H.; HALLING-SORENSEN, B.; TERNES, T. Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant. *Environmental Science e Technology*, v. 37, n. 18, p. 4021-4026, 2003.

ARNON, S.; DAHAN, O.; ELHANANY, S.; COHEN, K.; PANKRATOV, I.; GROSS, A.;RONEN, Z.; BARAM, S. AND SHORE, L. Transport of Testosterone and Estrogen from Dairy-Farm Waste Lagoons to Groundwater. *Environmental. Sciences. Technology*, v. 42, p. 5521–5526, 2008.

BAREL-COHEN, K.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M.; WENZEL, A.; MUELLER, J.;KRONFELD-SCHOR, N. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. *Journal of Environmental Management*, v. 78, n. 1, p. 16-23, 2006.

BECK, I.C.; BRUHN, R.; GANDRASS J.; RUCK W. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *Journal of Chromatography*, v. 1090, p. 98–106, 2005.

BIBBO, M.; HAENSZEL, W. M.; WIED, G. L.; HUBBY, M.; HERBST, A. L. A ,twenty-five-year follow-up study of women exposed to diethylsbestrol during pregnancy. *New England Journal of Medicine*, v.298, p.763-767, 1978.

BILA, M. D.; DEZOTTI, M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Conseqüências. *Química Nova*. vol. 30, nº. 3, p. 651-666, 2007.

BODZEK, M.; DUDZIAK, M. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination*, Oxford, v. 198, p 24-32, 2006.

BRASIL: Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde de 1996. Rio de Janeiro: Sociedade Civil Bem-Estar no Brasil, 1997.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo 2010. Disponível em:<www.ibge.gov.br>. Acessado em: 02 maio 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

CARBALLA, M.; MANTEROLE, G.;LARREA, L.; TERNES, T.; OMIL, F.; LEMA, J. Fate of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge, *Water Research*, v. 41, p. 2139 – 2150, 2007.

CARSON, R. *Silent Spring*. New York: Houghton Mifflin Company, 1962. 378 p.

CHAMPE P. C.; HARVEY R.A.; FERRIER D.R. *Bioquímica Ilustrada*, 3o Edição, Editora Artmed, 2006.

CHEMSPIDER. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>> Acesso em: 15 de março de 2016.

CHRISTIANSEN, L. B.; NIELSEN, M. W.; HELWEG, C. Feminization of fish the effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. Danish Environmental Protection Agency, 184 p, 2002.

COELHO, E. A. C. et al. O planejamento familiar no Brasil contexto das políticas de saúde: determinantes históricos. *Rev.Esc.Enf.USP*, v. 34, n. 1, p. 37-44, mar. 2000.

COLUCCI, M. S.; BORK, H. e TOPP, E. Persistence of Estrogenic Hormones in Agricultural Soils: I. 17 β -Estradiol and Estrone. *Journal Environmental Qual.*, v. 30, p. 2070 - 2076, 2001.

DIAS, R. V. A. Avaliação da ocorrência de microcontaminantes emergentes em sistemas de abastecimento de água e da atividade estrogênica do estinilestradiol. Dissertação de Mestrado em Engenharia Sanitária, Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

FALEIROS, V. P. O trabalho da política: saúde e segurança dos trabalhadores. São Paulo, Cortez, 1992.

FALONE, S. Desenvolvimento de Métodos para determinação do hormônio 17 alfa metiltestoterona em amostras de água e sedimento de piscicultura: ensaios toxicológicos com cladoceros. 179f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) Departamento de Engenharia Ambiental - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

FERNANDES, R. Estudos de remoção de 17 α -Ethinilestradiol de Águas para Abastecimento, utilizando Dióxido de Cloro, Hipoclorito de Sódio, Carvão Ativado em Pó e Tratamento Físico-químico. 180f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, Departamento de Engenharia Civil - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

FLORENTINO, E. R. Caracterização dos esgotos domésticos e efluentes das ETE's de Campina Grande, Guarabira e Sapé-PB. 1993. f.132. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande-PB, 1993.

FILHO, W. R.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 2, n. 3, p. 283- 288, 2007.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes Endócrinos no Ambiente. Química Nova, v.32, p.127- 132, 2007.

GOMES, E. F. Perdas de vazão e seus efeitos na operação do sistema de esgotamento sanitário de Campina Grande-PB. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB, 2013.

GOODMAN, L. S.; A. G., GILMAN. GOODMAN GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica. 10a ed. Mc Graw Hill, 2005.

GUERRA, A. B. Avaliação em escala de bancada do emprego de carvão ativado granular na remoção de microcistina-Lr na potabilização de águas eutrofizadas do semiárido nordestino. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

HEISTERKAMP I. GANDRASS J., RUCK W. Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC–MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples? *Anal Bioanalytical Chemistry*, v. 378, p. 709–715, 2004.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos analíticos, DOQCGCRE-008, 2011.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas., v.2, p. 13-25, 2010.

JOHNSON A. C.; BELFROID A.; DI CORCIA A. Estimating steroid oestrogen input into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent.; *Science Total Environment*; v. 256; p.163- 173; 2000.

JOLLY C.; KATSIADAKI L.; LE BELLE N.; MAYER L.; DUFOUR S. Development of a stickleback kidney cell culture assay for the screening of androgenic and anti-androgenic endocrine disrupters. *Aquatic Toxicology*, v. 79, p. 158–166, 2006.

JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T.; RICHLE, P. AND SIEGRIST, H. Removal of Estrogens in Municipal Wastewater Treatment under Aerobic and Anaerobic Conditions: Consequences for Plant Optimization. *Environmental Science Technology*, v. 38, p.3047- 3055, 2004.

KASSAB, N. Determinação de Hormônios Esteroides em Contraceptivos orais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). 201f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

KHANAL, S.K.; XIE, B.; THOMPSON, M.L.; SUNG, S.; ONG, S.K.; LEEUWEN, V. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. *Environmental Science e Technology*, v. 40, n. 21, p. 6547-6556, 2006.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, v. 35, p. 402–417, 2009.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, Oxford, v 45, p. 957-969, 2001.

LARSSON, D. G. J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; PETTERSSON, M.; BERG, A. H.; OLSSON, P. E.; FORLIN, L. Ethinyloestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aquatic. Toxicology*, v. 45, p. 91-97, 1999.

LEAL, E. S. Modelagem da degradação de cloro residual livre em sistemas de adução de água de abastecimento de porte médio. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

LEE E LIU. Degradation of 17 β -Estradiol and its Metabolites by Sewage bacteria. *Water, Air, and Soil Pollution*, v 134, p.353–368, 2002.

LINTELMANN J.; KATAYAMA A.; KURIHARA N. Endocrine disruptors in the environment.; *Pure Appl.Chem.*; v. 75; p.631-681; 2003.

LOPES, L. Estudo sobre a Ocorrência de Estrogênios em Aguas Naturais e Tratadas da Região de Jaboticabal – SP, 1227f, Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LUNA, B. J. C. Características de espaços-temporais do sistema do açude Acauã-PB, e seu atual índice de estado trófico. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal Paraíba/Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2008.

MACHADO, K.S. Determinação de Hormônios Sexuais Femininos na Bacia do Alto Iguaçu, Região Metropolitana de Curitiba-PR. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Paraná, 2010.

MCLACHLAN, J. A.; SIMPSON, E.; MARTIN, M. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 20, n. 1, p. 63- 75, 2006.

MEDEIROS, B. M.; MEDEIROS, C. M.; SILVINO, G. S.; ARAGÃO, R. Avaliação temporal do volume armazenado no açude Epitácio Pessoa (Boqueirão) no semiárido paraibano. In: CONGRESSO TÉCNICO CIENTÍFICO DA ENGENHARIA E DA AGRONOMIA, Fortaleza – CE, 15 a 18 de setembro de 2015.

MENESES, R. A. Diagnóstico operacional de sistemas de abastecimento de água: o caso de Campina Grande. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2011.

MIERZWA. J. C.; AQUINO. S. F.; VERAS, L. R. V. Remoção de Desreguladores Endócrinos. In: PADUA, V. L. (Coord.) Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Projeto PROSAB, Abes, 2009. 392p.

NASSIF M. C.; CIMAROSTI H. I.; ZAMIN L. L.; SALBEGO C. G. Estrógeno versus isquemia cerebral: hormônio feminino como Agente Neuroprodutor. *Infarma*; v. 17; 57-65; 2005.

NGHIEM, L.; SCHAFFER, A.; ELIMELECH, M. Removal of natural hormones by nanofiltration membranes: measurement, modeling and mechanisms. (2004). Disponível em <http://www.yale.edu/env/elimelech/PosterRemovalHormonesNF.pdf>. Acessado em 15 de Março de 2016.

PASSOS, C. R. L. Avaliação do impacto ambiental de efluentes de estações de tratamento de esgotos em corpos receptores no estado da Paraíba. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2011.

PARAÍBA. Companhia de Água e Esgotos da Paraíba (CAGEPA). Conclusão das Obras de Implantação do Sistema de Tratamento de Esgotos Sanitários da Cidade de Campina Grande-PB. João Pessoa-PB, 2007.

PARAÍBA. Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente. AESA - Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba, 2012.

PEDRO, J. M. A experiência com contraceptivos no Brasil: Uma questão de Geração. *Revista Brasileira de Historia*, São Paulo, v 23, n^o 45, pp 239-269, 2003

PERSHE, L. Aumenta o Consumo de Anticoncepcionais no Brasil, *Revista Health Latin América*, Publicação em Setembro de 2000. Disponível em www.boasaude.uol.com.br. Acessado em 01 de julho de 2015.

RAIMUNDO, C. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. 126f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Setembro, 2007.

RAMAN D.R.; WILLIAMS E.; LAYTON A.C.; BURNS R.; EASTER J.P.; DAUGHERTY A.; MULLEN M.; SAYLER G. Estrogen Content of Dairy and Swine Wastes. *Environmental Science Technology*, v 38, p. 3567-3573, 2004.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios Sexuais Estrógenos: Contaminantes Bioativos. *Química Nova*. vol. 29, nº. 4, p. 817-822, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO. L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Revista Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SANTAMARTA, J. 2001. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecol. e Desenv.Rur.Sustent.*, Porto Alegre, v.2, n.3, jul./set.2001

SEMPRE VIVA ORGANIZAÇÃO FEMINISTA (SOF). Esterilização feminina. São Paulo, 1994. v.1. (Série Saúde e Direitos Reprodutivos).

SERVOS, M. R.; BENNIE, D. T.; BURNISON B. K.; JORKOVIC, A.; MCINNIS, R.; NEHELI, T., SCHNELL, A.; SETO, P.; SMYTH, S. A; TERNES, T. A. *Science of the Total Environment*, v.336, p.155-170, 2005.

SHAPPELL, N.; VRABEL, M.; MADSEN, P.; HARRINGTON, G.; LARSEN, G.; BEACH, E.; HORWITZ, C; HUNT, P. AND COLLINS, T. Destruction of strogens Using Fe-TAML/Peroxide Catalysis, *Environmental. Science Technology*, v. 42, p.1296–1300, 2008.

SILVA, C. P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution*, v165, p. 38-58, 2012.

SIMMONDS, R.J. Chemistry of biomolecules: An introduction, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992.

SOUZA, N. C. 2011. Avaliação de Micropoluentes Emergentes em Esgotos e Águas Superficiais. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará – UFCE, Fortaleza, 2011.

SUDEMA. Superintendência de Administração do Meio Ambiente. DZS 205-Enquadramento dos corpos d'águas da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba, 1988. Disponível em: <http://www.aesa.pb.gov.br/enquadramento/diretrizes/DZS_205_Enquadramento_dos_Corpos_Dagua_da_Bacia_Hidrografica_do_Rio_Para%C3%ADba.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2016.

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 , v. 225, p.81-90, 1999.

TORRES, N. H. Monitoramento de resíduos dos hormônios 17 α - etinilestradiol 17 β -estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP. 2009. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências) - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, 2009.

TOXNET. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov>> Acesso: 15 de Março de 2016.

US.EPA, 1997; Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington D. C, 1997

VAZ, F. L.; MILFONT, M. L. B.; SOUTO-MAIOR, A. N.; GOUVEIA, E. R. Determinação da concentração de paclobutrazol por cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia. Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 281-283, 2007.

VENDRAME, R. Estudo das Relações entre Estrutura-Atividade de Progestagênios Contraceptivos, através da utilização de Parâmetros Físico-químicos calculados e métodos de Reconhecimento de Padrão. 402f Tese (Doutorado em Ciência na Área Físico-química). Instituto de Química-Universidade de Campinas, São Paulo, 1998.

WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G.; HE, J.; ZHANG, Y. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 606, p 194-201, 2008.

YING, G. -G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormones steroids in environment. *Environment International*, New York, v.28, p. 545-551, 2002.