

**Remoção da atividade estrogênica através da cloração:  
Problemas na implementação do Ensaio YES**

**Estrogenic activity removal through chlorination:  
Problems in implementation on *Yeast Estrogen Screen* test**

Taiza dos Santos Azevedo

Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil.

Renata de Oliveira Pereira

Professora Adjunta III do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ESA) da UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

Sue Ellen Costa Bottrel

Professora Adjunta I do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ESA) da UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

## **RESUMO**

Os desreguladores endócrinos são compostos químicos que interferem no sistema endócrino, mesmo que em baixas concentrações, alterando a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios. Os hormônios femininos são compostos naturalmente produzidos e excretados pelos animais de sangue quente, inclusive os seres humanos, e ao não serem eficientemente removidos nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) convencionais, estes compostos podem chegar aos corpos hídricos, afetando a comunidade aquática e podendo contaminar mananciais de abastecimento de água. Por esse motivo, torna-se relevante a pesquisa sobre tratamentos que removam esses hormônios. Destaca-se o 17 $\beta$ -estradiol (E2), por ser um dos hormônios mais ativos. Dessa maneira, o estudo avalia a ocorrência do E2 nas ETE, nas águas superficiais, água subterrâneas e água potável, no âmbito nacional e internacional, através de revisão bibliográfica. Também através de revisão, o estudo avalia a remoção do E2 através da cloração. Além disso, o trabalho também objetivou a implementação do ensaio *in vivo* YES (*Yeast Estrogen Screen*) para a análise e quantificação da remoção da atividade estrogênica por meio da cloração. Verificou-se que o E2 foi identificado nas diversas matrizes com concentrações na ordem de ng.L<sup>-1</sup> e  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>, inclusive em água tratada, e verificou-se que a cloração possui potencial de remoção de E2. Apesar das dificuldades enfrentadas na implementação e realização do ensaio, observou-se que a cloração teve um efeito positivo na remoção da atividade estrogênica.

**PALAVRAS-CHAVES:** Desreguladores endócrinos; hormônios; tratamento de água.

## **ABSTRACT**

Endocrine disrupters are chemicals compounds that even at low concentrations interfere in endocrine system altering synthesis, secretion, transport, connection, action and elimination of hormones. Female hormones are naturally produced and excreted by warm-blooded animals

including humans and because of these compounds are not efficiently removed in conventional Waste Water Treatment Plants (WWTP) they may reach water bodies, affecting aquatic community and being able to contaminate the main source of water supply. For that reason, research on treatments that remove these hormones becomes relevant. Among these, 17 $\beta$ -estradiol (E2) stands out for being one of the most active hormones. Thus, the study assessed the occurrence of E2 in WWTP, surface water, groundwater and potable water in national and international scope through bibliographic review. Also through bibliographic review, the study evaluates the removal of E2 through chlorination. Besides that, the study also aimed at the implementation of the *Yeast Estrogen Screen* test for analysis and quantification of the removal of estrogenic activity through chlorination. It was found that E2 was identified in different matrices with concentrations in the order of ng.L<sup>-1</sup> and  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>, including potable water and that chlorination has potential of remove E2. Despite the difficulties encountered in implementing and conducting the trial it was observe that chlorination had a positive effect on the removal of the estrogenic activity.

**KEYWORDS:** Endocrine disrupters; hormones, water treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo de micropoluentes tem aumentado nos últimos anos devido ao seu potencial efeito tóxico em organismos, mesmo em baixas concentrações. Dentre estes, destacam-se os desreguladores endócrinos, pois há indícios de que estes causem efeitos adversos no sistema reprodutivo de humanos e animais (BILA, 2005).

De acordo com Desbrow *et al.* (1998), dentre os compostos classificados como desreguladores endócrinos, os estrogênios naturais e sintéticos têm se destacado como os principais agentes responsáveis pela atividade estrogênica reportada nos efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE).

Dentre os estrogênios, destacam-se os hormônios naturais, por serem naturalmente produzidos e excretados pelos animais de sangue quente, inclusive os seres humanos. O 17 $\beta$ -estradiol (E2) é o mais ativo entre os estrogênios naturais e é considerado o estrogênio humano primário, uma vez que a estrona (E1) e o estriol (E3) são derivados desse composto. Além disso, é utilizado como o padrão de medição da atividade estrogênica (BILA, 2005).

A remoção ineficiente de tais compostos nas ETE propicia que estes sejam lançados em corpos hídricos, afetando a comunidade aquática e podendo contaminar as fontes de abastecimento de água (AQUINO *et al.*, 2013). Dessa maneira, é necessário que estes hormônios sejam removidos nas Estações de Tratamento de Água (ETA).

As etapas de clarificação presentes nos tratamentos convencionais de água (coagulação/floculação, sedimentação e filtração) não são eficientes na remoção destes compostos, sendo a desinfecção a etapa que possui potencial para a remoção de tais compostos (CHEN *et al.*, 2007).

O processo de desinfecção mais difundido no Brasil é a cloração, por apresentar vantagens econômicas e favorecer a remoção dos compostos com grupamentos fenólicos. A remoção de hormônios através da cloração está diretamente relacionada à concentração inicial da substância, com o tempo de contato e da presença de cloro residual livre. Alguns

subprodutos da oxidação com cloro também podem apresentar atividade estrogênica e, por esse motivo, o estudo dos subprodutos torna-se fundamental (PEREIRA, 2011).

Outro problema agregado a esses compostos é que tanto a identificação quanto a quantificação são difíceis de serem realizados, fazendo com que as análises desses compostos estejam associadas a um elevado custo e, por esse motivo, raramente são realizadas. Outro agravante é que não existem diretrizes ou regulamentações que estabeleçam limites de lançamento para essas substâncias (FISCHER, 2013).

Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência do E2 nas ETE, nas águas superficiais, águas subterrâneas e águas tratadas em um panorama nacional e internacional e avaliar a remoção do E2 através do processo de cloração em estudos previamente realizados, disponíveis em plataforma de livre acesso. Além disso, objetivou implementar uma metodologia de análise de atividade estrogênica no Laboratório de Qualidade Ambiental (LAQUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) para posterior estudo da remoção da atividade estrogênica do 17 $\beta$ -estradiol através de ensaios de cloração, investigando a influência do tempo de contato da reação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo da ocorrência do E2 nas ETE, águas superficiais, águas subterrâneas e águas tratadas, além do estudo da remoção deste composto através da cloração, foi realizado através de revisão bibliográfica, no âmbito nacional e internacional, de artigos científicos, dissertações de mestrado e teses de doutorado dos anos de 1998 a 2016.

A implementação do Ensaio YES e realização dos ensaios de cloração foram realizados no LAQUA no período de setembro a dezembro de 2016. Para início da implementação do Ensaio YES foi realizado treinamento no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em agosto de 2015.

### 2.1 Ensaio *Yeast Estrogen Screen* (YES)

A análise da atividade estrogênica foi feita através do Ensaio *in vitro* YES. Esse método é realizado a partir de uma linhagem modificada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa linhagem contém um receptor de estrogênio humano (hER) que, em contato com compostos que possuem atividade estrogênica, é capaz de produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase. Essa enzima metaboliza o composto cromogênico clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosina (CPRG) adicionado ao meio, formando lactose e vermelho de clorofenol, promovendo a alteração da cor de amarelo para vermelho (ROUTLEDGER & SUMPTER, 1996).

A metodologia adotada possui diversas vantagens, tais como: facilidade de execução uma vez que o teste seja implementado; alta reprodutibilidade; tempo reduzido de ensaio; resultado perceptível a olho nu; obtenção de resposta para diversos compostos simultaneamente; e elevada sensibilidade, com limite de detecção de 2 ng.L<sup>-1</sup>. Mostram-se como desvantagens a possibilidade do aparecimento de resultados falso positivos devido a possíveis contaminações, a formação de subprodutos devido a degradação do composto

cromogênico que elevam a atividade estrogênica da amostra e acarreta erros nos resultados do teste e alta sensibilidade da levedura utilizada no teste (ROUTLEDGER & SUMPTER, 1996).

O preparo das soluções deve ser feito de maneira a evitar qualquer tipo de contaminação, uma vez que a maior preocupação do teste é evitar resultados falsos positivos. Por esse motivo, todo o material envolvido no preparo das soluções foi previamente limpo com água de torneira, deixadas em banho ácido (ácido nítrico 20%) por 24 horas, enxaguadas com água deionizada e rinsadas com etanol absoluto. De acordo com Bila (2005), todos os reagentes devem apresentar alto grau de pureza e devem ser utilizados exclusivamente para a realização deste teste. Ainda para evitar contaminação, todos os frascos foram vedados com plástico filme.

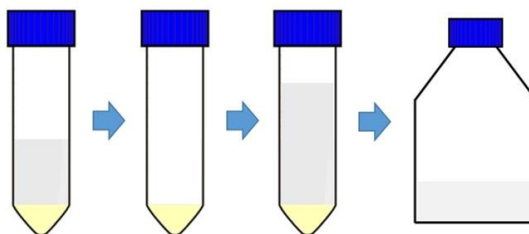
As soluções de meio mínimo, vitamina, glicose, ácido L-aspartico, L-treonina, sulfato de cobre (II), CPRG ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), meio de cultivo, meio de análise e solução estoque de  $17\beta$ -estradiol em etanol ( $54,48 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ ) utilizadas no teste foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Routledger & Sumpter (1996).

### 2.3 Cultivo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFV e pelo Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). O procedimento de utilização da levedura adotado foi o utilizado no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, que está de acordo com Routledger & Sumpter (1996).

O congelamento da linhagem foi realizado a partir da adição de 5mL da cultura da levedura em um tubo falcon de 15mL. Este tubo foi centrifugado a 2000 rpm, ficando o sobrenadante separado. Este foi retirado e descartado, e no tubo foi adicionado 5mL de uma solução com meio mínimo e glicerol, este na proporção de 15%. Ao término do procedimento, o tubo foi vedado com parafilme e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , podendo ser utilizado em até 4 meses.

Para utilizar novamente a linhagem esta foi descongelada e o sobrenadante, que fica separado da levedura, foi descartado. Neste tubo foram adicionados 10mL do meio de cultivo que seriam posteriormente transferidos para um frasco T de propagação celular, aumentando a superfície de contato das células com o meio de cultura (Figura 1).



**Figura 1** - Esquema do processo de descongelamento da linhagem.

Para a propagação da cultura que foi utilizada no teste foram adicionados 10mL de meio de cultivo e  $100\mu\text{L}$  de levedura em um frasco T. Este foi mantido em uma estufa a  $30^{\circ}\text{C}$

durante 24 horas. Caso o teste fosse realizado em 48 ou 72 horas, o mesmo procedimento era adotado, diferindo o volume de levedura, que deveria ser igual a 50 $\mu$ L.

## 2.4 Procedimento de teste YES

Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os ensaios realizados em placas de 96 poços. As diluições da curva de calibração foram realizadas em etanol absoluto na proporção 1:2, fazendo com que a curva de E2, utilizada como referência para comparação das concentrações, abrangesse as concentrações de 54,48  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> a 0,27 ng.L<sup>-1</sup> do hormônio (Figura 2, linhas A e C). Esta mesma diluição 1:2, porém em água, foi realizada para a amostra (Figura 2, linhas E e G), sendo intercaladas por fileiras em branco que continham apenas etanol (Figura 2, linhas B, D, F e H).

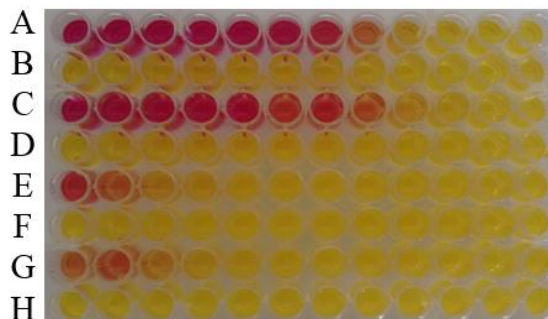


Figura 2 - Representação da divisão da placa.

Uma alíquota de 10  $\mu$ L da placa de diluição foram transferidas para a placa de análise. Essa placa de análise foi deixada em repouso por 15 minutos para que as linhas referentes à curva e aos brancos sofressem evaporação. As amostras não sofreram evaporação pois não são diluídas em etanol. Após esse período, 200  $\mu$ L do meio de análise (composto por 25 mL de meio de cultivo, 25  $\mu$ L da levedura e 200  $\mu$ L de CPRG) foram adicionados nos poços das linhas A, B, C, D, F e H, enquanto 190  $\mu$ L do meio de análise foram adicionados nas linhas referentes a amostra (E e G). Dessa maneira, o volume final de todos os poços foi de 200  $\mu$ L.

Em seguida, as placas foram seladas e inseridas em um agitador orbital ajustado para 100 rpm por dois minutos. As placas foram então incubadas a 30°C por 72 horas. Após esse período, as placas foram agitadas novamente por dois minutos e em seguida permaneceram em repouso por uma hora, estando prontas para serem submetidas à determinação da absorbância à 539 nm para cor e 620 nm para turbidez na leitora de placas.

## 2.5 Análise dos dados do ensaio YES

Através dos resultados de absorbância das linhas referentes à curva de calibração foram elaborados gráficos com as curvas dose-resposta do teste, em formato sigmoidal. Essas curvas relacionam os valores de absorbância corrigida (eixo Y) em função da concentração das amostras (eixo X) em escala logarítmica (Figura 3).

Após a elaboração dessa curva, obteve-se o valor de EC<sub>50</sub> (concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da  $\beta$ -galactosidase), de A (máxima indução), B (limite de detecção) e p (inclinação do trecho

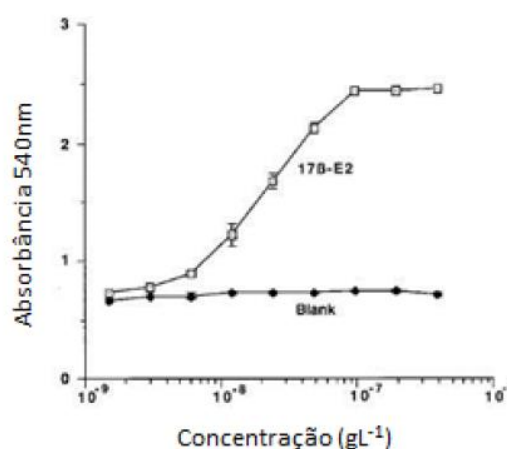


Figura 3 - Curva dose-resposta da curva de E2. Fonte: Routledge & Sumpter (1996).

linear da curva entre A e B) da curva padrão de 17 $\beta$ -estradiol através do ajuste sigmoidal. O tratamento dos dados foi realizado no Software Oringin® 6.0. A partir dos valores obtidos para as diferentes concentrações é possível calcular a concentração da amostra em equivalentes de estradiol (EQ-E2). Para critério de comparação entre testes, Bila (2005) determinou a potência relativa estrogênica para cada amostra, sendo determinada pela razão entre o valor de EC<sub>50</sub> da curva padrão e o valor de EC<sub>50</sub> da amostra. Quanto mais próximo ou maior que 1 se apresenta o valor da potência relativa estrogênica, maior é a estrogenicidade presente na amostra. Quanto mais próximo de 0 menor será a estrogenicidade presente.

Em algumas amostras pode ocorrer toxicidade, levando a inibição do crescimento da levedura utilizada no ensaio. Essa inibição, de acordo com Frische *et al.* (2009), pode ser calculada pela razão entre a média da leitura de absorbância a 620 nm da duplicata de cada um dos poços da linha da amostra e a média da leitura de absorbância a 620 nm para as duas linhas de branco correspondentes à cada amostra analisada em duplicata. Dessa maneira, o crescimento da levedura que é estimado pela turbidez é comparado nas linhas de amostras e de branco.

## 2.6 Ensaio de oxidação com cloro

A matriz utilizada para os ensaios foi uma amostra de água de mina, e a sua caracterização inicial foi realizada através dos parâmetros temperatura, pH, cor, condutividade e turbidez. Para avaliar a influência do tempo de contato, foram utilizados dois tempos de contato distintos, mantendo-se fixo a concentração de hormônio e a dose de cloro. Já a identificação da atividade estrogênica do E2 e dos possíveis subprodutos formados foi realizada através do ensaio *in vitro* YES.

Foram realizados ensaios com água de estudo na concentração de E2 1 $\mu$ g.L<sup>-1</sup>, dose de cloro 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e tempos de contato iguais a 1 minuto e 30 minutos. Os ensaios foram realizados em duplicata, resultando em quatro ensaios. Dessa maneira, para cada ensaio foram analisadas duas amostras: a água de estudo com 17 $\beta$ -estradiol e água de estudo com 17 $\beta$ -estradiol após o processo de cloração.

O oxidante utilizado foi o hipoclorito de sódio 10-15% (Sigma-Aldrich), sendo preparada uma solução estoque de cloro com concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de Cl<sub>2</sub>. Essa solução foi armazenada a 4°C em frasco âmbar. A partir dessa solução foi preparada a solução com concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Cl<sub>2</sub> utilizada no ensaio de cloração. Para garantir a concentração inicial da solução foi realizada uma calibração, uma vez que a concentração do hipoclorito apresenta variação de acordo com a temperatura. Essa calibração foi realizada a partir da análise de cloro total utilizando o método DPD com o kit da Hach na faixa de 0,02-2,00 mg.L<sup>-1</sup> de Cl<sub>2</sub>.

A solução estoque de 17 $\beta$ -estradiol com concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> foi realizada a partir do padrão de hormônio (Sigma-Aldrich) e preparada em metanol, sendo armazenada a 4°C em frasco âmbar.

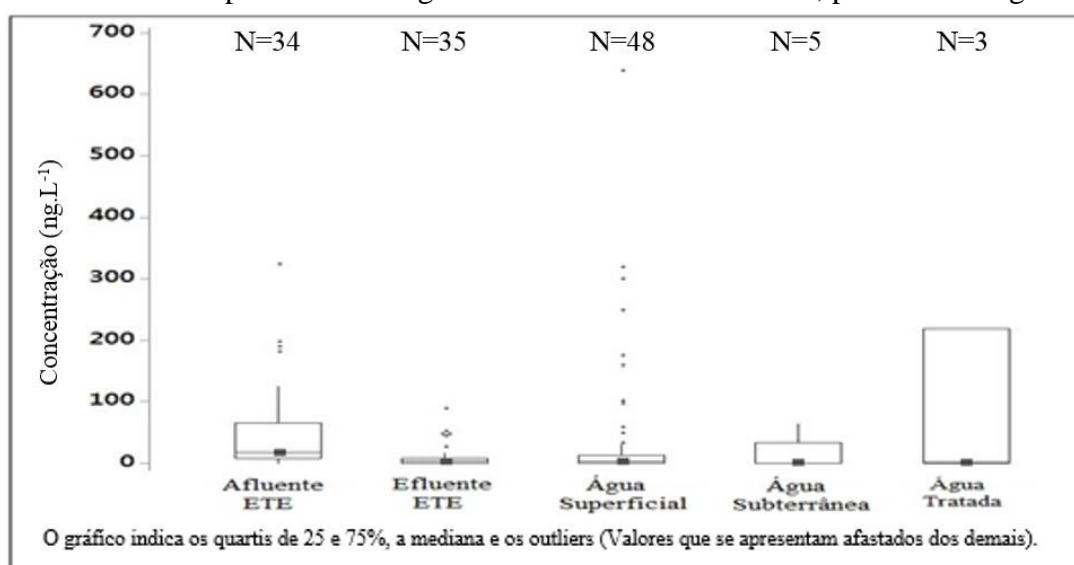
Foram preparados 2 litros da água de estudo com E2, sendo 500 mL para cada ensaio realizado. Dentre estes 500 mL, 100 mL eram separados para a caracterização da água com E2 e 400 mL eram submetidas aos ensaios de cloração. Dessa maneira, foram adicionados em um béquer sob agitação magnética 400 mL da amostra com hormônio e a dose de cloro que

seria aplicada. Ao atingir o tempo de contato determinado nos ensaios, 200 mL foram separados para realizar as análises de cloro livre e cloro total, pH e condutividade, e no volume restante de 200 mL era aplicada uma dose de 0,1 mL de metabissulfito de sódio a 3% (m/V) para cada 100 mL de amostra para eliminar o cloro residual restante e posterior determinação da cor, turbidez, temperatura e atividade estrogênica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Ocorrência do 17 $\beta$ -estradiol em matrizes ambientais no âmbito internacional

De acordo com os dados obtidos na literatura representados no gráfico da Figura 4, observou-se que há uma redução nas concentrações efluente e afluente. A mediana dos afluentes encontra-se próxima a 18 ng.L<sup>-1</sup> e a mediana dos efluentes, próxima a 4 ng.L<sup>-1</sup>.



**Figura 4** - Ocorrência internacional do E2 em diversas matrizes. A letra N representa o número de estudos avaliados. **Fonte:** **Afluente ETE:** Andrasi *et al.* (2011); Baronti *et al.* (2000); Behera *et al.* (2011); Carballa *et al.* (2004); Cargouet *et al.* (2004); Dorabawilla *et al.* (2005); Fernandez *et al.* (2007); Forrez *et al.* (2009); Hashimoto *et al.* (2007); Huang *et al.* (2014); Ifelebuegu (2011); Jiang *et al.* (2005); Jonhson *et al.* (2000); Lagana *et al.* (2004); Larsson *et al.* (1999); Lee *et al.* (2005); Liscio *et al.* (2009); Martin *et al.* (2012); Mullet *et al.* (2008); Nakada *et al.* (2006); Nie *et al.* (2012); Pailler *et al.* (2009); Ra *et al.* (2011); Salgado *et al.* (2012); Servos *et al.* (2005); Suri *et al.* (2012); Tan *et al.* (2007); Ternes *et al.* (1999); Verstraeten *et al.* (2003); Viglino *et al.* (2008); Zorita *et al.* (2009). **Efluente ETE:** Baronti *et al.* (2000); Belfroid *et al.* (1999); Binger *et al.* (2013); Carballa *et al.* (2004); Cargouet *et al.* (2004); Chen *et al.* (2007); Desbrow *et al.* (1998); Dorabawilla *et al.* (2005); Fernandez *et al.* (2007); Hashimoto *et al.* (2007); Huang *et al.* (2014); Ifelebuegu (2011); Jonhson *et al.* (2000); Kim *et al.* (2007); Kuch *et al.* (2001); Lagana *et al.* (2004); Larsson *et al.* (1999); Lee *et al.* (2005); Liscio *et al.* (2009); Muller *et al.* (2008); Nakada *et al.* (2006); Paylowski *et al.* (2004); Ra *et al.* (2011); Servos *et al.* (2005); Snyder *et al.* (1999); Tan *et al.* (2007); Ternes *et al.* (1999); Verstraeten *et al.* (2003); Viglino *et al.* (2008); Wright-Walters *et al.* (2007); Xiao *et al.* (2001); Ying *et al.* (2009); Zorita *et al.* (2009). **Água superficial:** Ahmad (2007); Andrásí *et al.* (2013); Avar *et al.* (2016); Baronti *et al.* (2000); Beck *et al.* (2005); Belfroid *et al.* (1999); Cargouet *et al.* (2004); Chen *et al.* (2007); Desbrow *et al.* (1998); Farré *et al.* (2007); Furuichi *et al.* (2004); Gibson *et al.* (2007); Gorga *et al.* (2013); Hamilton *et al.* (2016); Hohenblum *et al.* (2004); Hu *et al.* (2005); Isobe *et al.* (2003); Jiang *et al.* (2012); Klingelhofer *et al.* (2015); Kolok *et al.* (2007); Kolpin *et al.* (2002); Kuch *et al.* (2001); Lagana *et al.* (2004); Liu *et al.* (2004); Liu *et al.* (2015); Matsumoto *et al.* (2002); Mibu *et al.* (2004); Mol *et al.* (2000); Pojana *et al.* (2007); Quintana *et al.* (2004); Ra *et al.* (2011); Rocha *et al.* (2013); Shin *et al.* (2011); Snyder *et al.* (1999); Solé *et al.* (2000); Sun *et al.* (2016); Truter *et al.* (2016); Vethaak *et al.* (2005); Vigano *et al.* (2008); Viglino *et al.* (2008); Vulliet *et al.* (2011); Williams *et al.* (2003); Xiao *et al.* (2001); Xu *et al.* (2014); Yang *et al.* (2006); Yang *et al.* (2015); Ying *et al.* (2009); Zuo *et al.* (2006). **Água subterrânea:** Hohenblum *et al.* (2004); Karnjanapiboonwong *et al.* (2011); Thompson *et al.* (2009); Vulliet *et al.* (2008); Vulliet *et al.* (2011). **Água tratada:** Kuck *et al.* (2011); Liu *et al.* (2015).

A concentração máxima de E2 encontrada em águas superficiais foi de 640 ng.L<sup>-1</sup>, identificada por Solé *et al.* (2000) na Espanha, valor muito superior à mediana (3,60 ng.L<sup>-1</sup>). Em relação à análise das medianas, observa-se que as concentrações identificadas nas águas

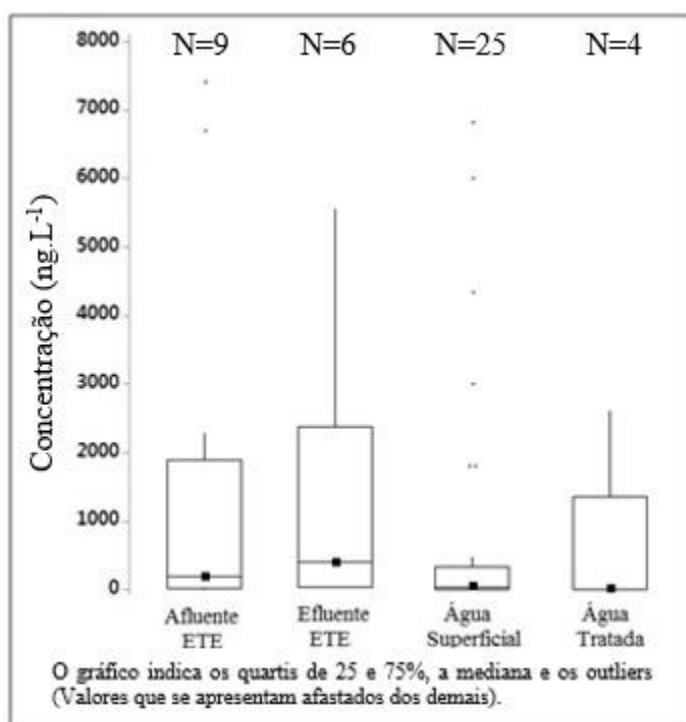
superficiais são inferiores à do efluente de ETE, fato esperado pela ocorrência da diluição do efluente no corpo hídrico.

Em geral, foram relatadas baixas concentrações de E2 nas águas subterrâneas, com mediana igual a 1,30 ng.L<sup>-1</sup>, e o valor máximo de 64 ng.L<sup>-1</sup> foi identificado por Thompson *et al.* (2009) nos Estados Unidos, valor dez vezes inferior ao valor máximo encontrada nas águas superficiais. Isso é esperado uma vez que águas subterrâneas se encontram mais protegidas dos lançamentos de efluentes que as águas superficiais.

Foram identificados apenas 3 valores sobre ocorrência do E2 em águas tratadas, sendo estes muito discrepantes entre si. O maior valor foi reportado por Liu *et al.* (2015) na China, sendo igual a 220 ng.L<sup>-1</sup>, concentração muito elevada para água potável considerando que a mediana identificada nos estudos de E2 em afluentes domésticos foi igual a 18 ng.L<sup>-1</sup>. O menor valor foi identificado por Kuch *et al.* (2011) na Alemanha, sendo igual a 0,20 ng.L<sup>-1</sup>, mais próximo da mediana (2,10 ng.L<sup>-1</sup>).

### 3.2 Ocorrência do 17β-estradiol em matrizes ambientais no âmbito nacional

Observando-se as concentrações de E2 identificadas no âmbito nacional obtidas na literatura, percebe-se na Figura 5 que todas as matrizes apresentaram concentrações mais elevadas em comparação ao panorama internacional. Essas diferenças podem estar relacionadas a diversos fatores, como aspectos culturais, uso de hormônios em anticoncepcionais ou tratamentos hormonais, tipo de tratamento utilizado nas ETEs, entre



**Figura 5** – Ocorrência nacional do E2 em diversas matrizes. A letra N representa o número de estudos avaliados. **Fonte:** **Afluente ETE:** Araújo (2006); Froehner (2011); Ghiselli (2006); Pessoa *et al.* (2011); Pessoa *et al.* (2014); Sodré *et al.* (2010); Souza (2008); Souza (2011); Ternes *et al.* (1999). **Efluente ETE:** Brandt (2012); Froehner (2011); Ghiselli (2006); Pessoa *et al.* (2011); Pessoa *et al.* (2014); Souza (2008). **Água superficial:** Gerolin (2008); Ghiselli (2006); Lopes (2007); Raimundo (2007); Sodré *et al.* (2007). **Água tratada:** Dias *et al.* (20015); Gerolin (2008); Ghiselli (2006); Lopes (2007).

outros. Os tratamentos terciários nas ETE são amplamente utilizados internacionalmente, enquanto no Brasil a maioria das estações apresenta nível secundário de tratamento (IBGE, 2010). Em relação às águas superficiais, essa elevada concentração pode estar associada ao fato de que 59,2% do efluente doméstico gerado no Brasil não são tratados, sendo lançados diretamente no corpo receptor (SNIS, 2014).

Foram analisados estudos em São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio de Janeiro, Paraná e Ceará, sendo o maior número de estudos localizados na Região Sudeste. Dessa maneira, são necessários mais estudos sobre as concentrações de hormônios sejam realizados em todo o país, para que seja possível identificar tendências e propor soluções.



O estudo onde foi reportada a maior concentração de E2 foi realizado por Souza (2008) em Campo Grande (MS), que encontrou valor de 7400 ng.L<sup>-1</sup> em afluente de ETE. O estudo de efluente de ETE que reportou o maior valor (5560 ng.L<sup>-1</sup>) foi realizado por Ghiselli (2006) na Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia, em Campinas (SP). O tratamento utilizado nessa ETE é a combinação de reator anaeróbico de fluxo ascendente com lagoa facultativa. Ambos valores de afluente e efluente de ETE são muito elevados em comparação com os relatados internacionalmente e, ainda, apresentaram-se valores máximos muito acima das medianas (182 ng.L<sup>-1</sup> e 397 ng.L<sup>-1</sup>, respectivamente).

As concentrações repostadas nos estudos das águas superficiais apresentam-se inferiores, como esperado, porém valores discrepantes são observados. Dentre eles, destaca-se o maior valor encontrado (6806 ng.L<sup>-1</sup>), identificado em São Paulo por Raimundo (2007) no Ribeirão Anhumas, muito superior à mediana (37,4 ng.L<sup>-1</sup>).

O valor máximo de E2 encontrado em água tratada foi identificado por Ghiselli (2006), também em São Paulo, sendo igual a 2600 ng.L<sup>-1</sup>, valor muito acima da mediana (5,14 ng.L<sup>-1</sup>). Sendo assim, observa-se que são encontradas elevadas concentrações de E2 em água potável, mesmo que raramente, tanto no âmbito nacional como no âmbito internacional. Por esse motivo é necessário que as etapas constituintes do tratamento de água sejam capazes de remover tais substâncias.

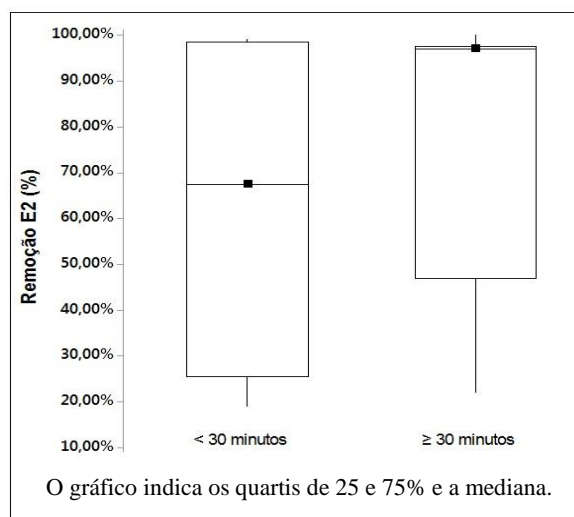
Apesar de existirem estudos em águas subterrâneas no Brasil, como o apresentado por Souza (2008), não foi identificado nenhum artigo que reportasse a quantificação desse hormônio.

### 3.3 Remoção do 17β-estradiol através da cloração

Analisando dados encontrados na literatura, como demonstrado na Figura 6, observa-se que maiores tempos de contato implicam em remoções mais elevadas, podendo alcançar valores próximos a 100%. Para tempos de contato inferiores a 30 minutos, a remoção apresenta uma elevada amplitude, abrangendo valores de 19 a 96%.

Foram utilizadas doses de cloro de 0,5 a 3,6 mg.L<sup>-1</sup>, e tempo de contato de 10 minutos até 24 horas, e a remoção média identificada em todos os trabalhos foi de 58%. Os estudos que obtiveram remoção acima da média utilizaram maiores tempo de contato. Pereira *et al.* (2011) em seu estudo obteve remoção de 97% em tempo de contato igual a 10 minutos. Nesse caso, a essa elevada remoção pode estar associada à elevada concentração inicial do hormônio (100μ.L<sup>-1</sup>).

A menor remoção reportada foi de 19%, utilizando-se dose de cloro igual a 1 mg.L<sup>-1</sup> e tempo de contato igual a 10 minutos (CHEN *et al.*, 2007), enquanto que a maior remoção foi



**Figura 6** – Remoção do E2 através da cloração. **Fonte:** Alum *et al.* (2004); Chen *et al.* (2007); Degorde *et al.* (2004); Pereira *et al.* (2011); Souza *et al.* (2014); Westerhoff *et al.* (2005).

de 100%, utilizando dose de cloro de 3,6 mg.L<sup>-1</sup> e tempo de contato de 24 horas (WESTERHOFF *et al.*, 2005).

Porém, uma desvantagem relatada na cloração é a formação de subprodutos (PEREIRA *et al.*, 2011). Dessa maneira, apesar de remover o composto-alvo, a atividade estrogênica da amostra pode aumentar (HU *et al.*, 2003). O Ensaio YES, por apresentar efeito sinérgico, apresenta em seu resultado tanto a atividade estrogênica do E2 quanto a de seus subprodutos, caso estes possuam atividade estrogênica.

### 3.4 Implementação do Ensaio YES no LAQUA

Para a realização dos primeiros ensaios todas as soluções utilizadas no teste foram preparadas em água deionizada. Foi preparada uma solução padrão de E2 em etanol absoluto com concentração igual a 54,48 mg.L<sup>-1</sup>, para posterior preparo da solução da curva padrão do ensaio com concentração igual a 54,48 µg.L<sup>-1</sup>. Da mesma maneira, foi preparada uma solução padrão de E2 em metanol com concentração igual a 100 mg.L<sup>-1</sup> para que posteriormente fosse preparada a solução de 1 µg.L<sup>-1</sup> utilizada nos ensaios. As soluções foram preparadas utilizando-se balança com alta precisão.

Os resultados obtidos nos ensaios YES são apresentados na Tabela 1, identificando a data do teste, os procedimentos adotados, os resultados obtidos e as hipóteses levantadas. As imagens dos ensaios são apresentadas na Figura 7.

**Tabela 1** – Resumo dos Ensaio YES realizados no Laboratório de Qualidade Ambiental (LAQUA). (Continua)

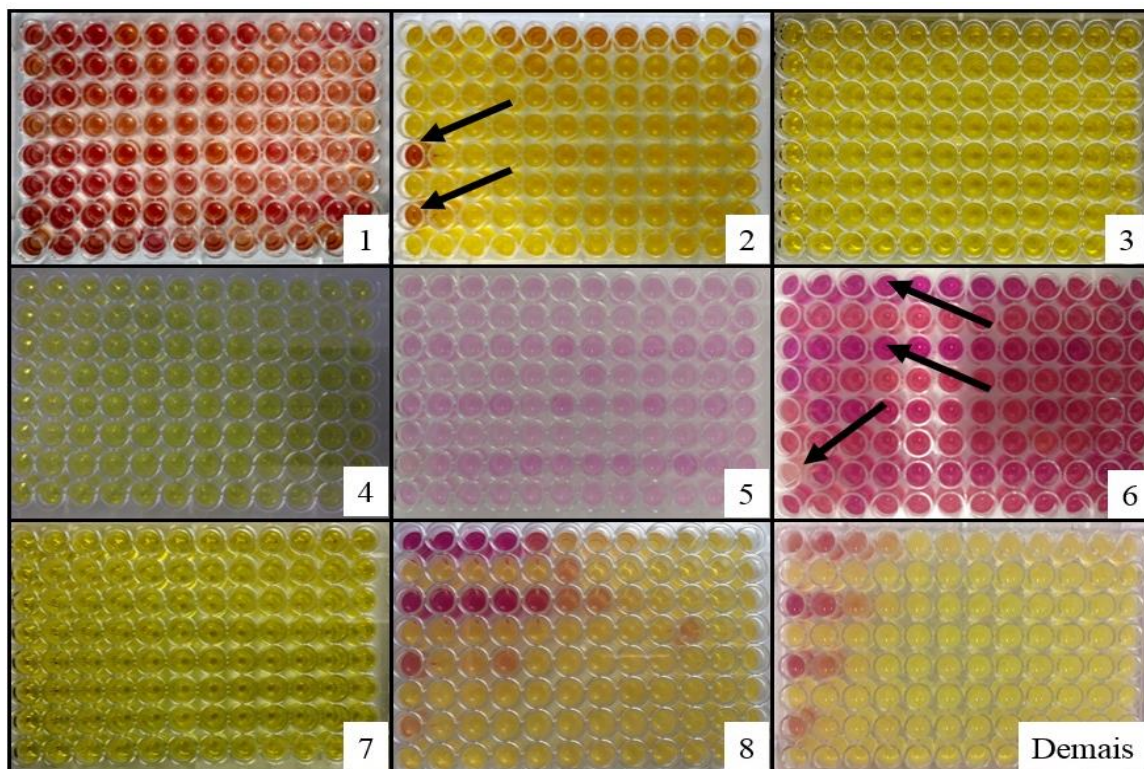
Teste	Procedimentos	Resultado	Hipóteses
<b>Primeiro teste (20/09/2016)</b>	As soluções utilizadas no teste foram preparadas em água deionizada e a levedura utilizada foi trazida do Laboratório de Ecotoxicologia da UFV	A placa inteira apresentou mudança na coloração, indicando que houve contaminação	O erro foi associado a um possível erro de pipetagem, ao procedimento de lavagem de vidrarias ou às soluções utilizadas no teste
<b>Segundo teste (30/09/2016)</b>	As vidrarias passaram a ser limpas com água de torneira, deixadas de molho em extran, enxaguadas com água de torneira, deixadas em banho ácido (ácido nítrico 20%) por 24 horas, enxaguadas com água deionizada e rinsadas com etanol absoluto	As linhas referentes à amostra de 1 µg.L <sup>-1</sup> apresentaram resultados aparentemente satisfatórios, mas as linhas das curvas não apresentaram coloração característica	Hipótese levantada de que a solução da curva ou a solução de meio de análise possuía algum composto tóxico para as leveduras ou que a levedura havia sido modificada
<b>Terceiro teste (07/10/2016)</b>	A solução padrão de E2 foi refeita no Laboratório de Ecologia Aquática do ICB e durante a realização dos testes o etanol foi deixado evaporar por 15 minutos	Após 72 horas a placa inteira não apresentou modificação de cor	Hipótese reforçada de que a levedura havia sido modificada e não continha mais o gene receptor de estrogênio, ou que a solução de hormônio utilizada apresentava problema

**Tabela 1** – Resumo dos Ensaios YES realizados no Laboratório de Qualidade Ambiental (LAQUA). (Continuação)

<p><b>Quarto teste (11/10/2016)</b></p>	<p>A fim de identificar se o problema estava relacionado ao hormônio utilizado, foi realizado um teste utilizando uma amostra de efluente</p>	<p>Mesmo assim a amostra não obteve a coloração esperada e a placa inteira não apresentou modificação da cor</p>	<p>Descartou-se a possibilidade de alteração no padrão de hormônio utilizado e a hipótese de que a levedura havia sido modificada pela alta quantidade de repiques foi reforçada</p>
<p><b>Quinto teste (14/10/2016)</b></p>	<p>Uma linhagem de levedura mais antiga foi descongelada de acordo com o procedimento de Routledge &amp; Sumpter (1996), representado na Figura 1, para a realização do teste</p>	<p>Percebeu-se que a placa voltou a apresentar coloração rosa</p>	<p>A hipótese de que a levedura havia sido modificada pelo número de repiques foi reforçada. Além disso, os brancos apresentaram coloração rosa indicando contaminação das soluções</p>
<p><b>Sexto teste (21/10/2016)</b></p>	<p>Uma nova linhagem foi obtida no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFV. Além disso, a centrífuga do Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microorganismos (LEBIOMM) da UFJF foi disponibilizada, permitindo a manutenção da linhagem. As soluções foram refeitas utilizando água destilada</p>	<p>A placa apresentou contaminação, mas as curvas apresentaram coloração mais intensa. A linha G era composta por um efluente sintético. Apesar de não ser possível calcular a concentração de atividade estrogênica, percebe-se que esse efluente foi tóxico para a levedura</p>	<p>Como todas as soluções já haviam sido refeitas com os devidos cuidados para evitar contaminações, suspeitou-se que o extrato poderia estar causando atividade estrogênica e, por esse motivo, o procedimento de limpeza foi alterado.</p>
<p><b>Sétimo teste (01/11/2016)</b></p>	<p>As vidrarias passaram a ser previamente limpas com água da torneira, deixadas em banho ácido (ácido nítrico a 20%) por 24 horas, enxaguadas com água deionizada e posteriormente com risadas em etanol. Porém, no dia do teste a levedura não apresentou crescimento dentro da faixa ótima de leitura de absorbância a 620nm (de 0,8 a 1,0), ficando abaixo de 0,6</p>	<p>Após 72 horas toda a placa apresentou coloração amarela</p>	<p>Esse resultado indicou problemas com o crescimento da levedura</p>
<p><b>Oitavo teste (04/11/2016)</b></p>	<p>Foi descongelada uma nova linhagem para a realização do próximo ensaio, que ocorreu no dia 04 de novembro de 2016. A levedura apresentou crescimento dentro da faixa esperada, com absorbância igual a 0,846</p>	<p>O ensaio apresentou resultados bastante satisfatórios, apresentando pouquíssimos pontos de contaminação</p>	

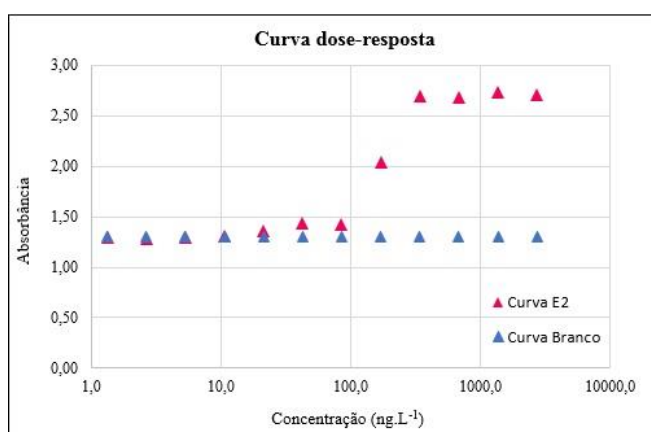
**Tabela 1** – Resumo dos Ensaios YES realizados no Laboratório de Qualidade Ambiental (LAQUA). (Continuação)

<b>Demais testes</b>	A partir disso, o procedimento realizado no oitavo teste foi repetido. Porém, a levedura sempre apresentou crescimento abaixo do esperado	Os ensaios apresentaram mudança de cor, mas com intensidades menores do que as esperadas	As hipóteses levantadas foram de que havia problemas no protocolo de manutenção na linhagem ou algum reagente que compõe o meio de cultivo apresentava problema
----------------------	---	--	---



**Figura 7** – Fotos dos ensaios YES realizados.

A curva dose-resposta desenvolvida a partir da leitura da absorbância das amostras de curva de E2 do oitavo teste (04/11/2016) ficou dentro do esperado, com formato sigmoidal (Figura 8). A amplitude da faixa de absorbância, que corresponde à indução da  $\beta$ -galactosidase, se aproximou do resultado obtido por Bila (2005). No seu estudo, esses valores se encontraram entre 1,0 e 3,5. Apesar disso, o valor do  $EC_{50}$  foi abaixo do esperado, não estando de acordo com a literatura e, por esse motivo, o teste não foi validado. Esse valor é dependente do número inicial de células da levedura e o tempo de incubação.



**Figura 8** – Curva dose-resposta do oitavo teste.

A partir desse resultado positivo foram realizados os ensaios de cloração com a água de estudo.

### 3.5 Problemas e procedimentos na manutenção da levedura

Na Tabela 2 são apresentados os problemas e procedimentos utilizados na manutenção da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, identificando a data do teste, os procedimentos adotados, os resultados obtidos e as hipóteses levantadas. A leitura de absorbância a 620 nm, que é uma estimativa do número de células, deve se encontrar entre 0,8 e 1,0. Essa leitura sempre se encontrou dentro da faixa esperada até o dia 01/11/2016. Por esse motivo não foi considerada a hipótese de problemas com o crescimento até esse dia.

**Tabela 2** – Resumo dos problemas e procedimentos com as leveduras no LAQUA. (Continua)

Teste	Procedimentos	Resultado	Hipóteses
<b>30/09/2016</b> (Figura 7.2)	A levedura foi inicialmente cedida em agosto de 2016 pela UFV e foi mantida através dos repiques em intervalos de 1 a 3 dias, uma vez que o LAQUA não possuía centrífuga, que é necessária para o congelamento da levedura	As linhas referentes à amostra de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram resultados aparentemente satisfatórios, mas as linhas das curvas não apresentaram coloração característica	Hipótese levantada de que a solução da curva ou a solução de meio de análise possuía algum composto tóxico para as leveduras ou que a levedura havia sido modificada
<b>11/10/2016</b> (Figura 7.4)	A fim de identificar se o problema estava relacionado ao hormônio utilizado, foi realizado um teste utilizando uma amostra de efluente	A placa inteira não apresentou mudança na coloração	A hipótese de que a levedura havia sido modificada e não continha mais o gene receptor de estrogênio foi reforçada
<b>14/10/2016</b> (Figura 7.5)	Uma linhagem mais antiga, proveniente da UFV foi descongelada de acordo com o protocolo de Routledge & Sumpter (1996)	A placa inteira apresentou mudança na coloração	A hipótese de que a levedura havia sido geneticamente modificada foi reforçada
<b>21/10/2016</b> (Figura 7.6)	Foi obtida uma nova linhagem da UFV e permissão de uso da centrífuga do LEBIOMM para manutenção da levedura. Entretanto, esse laboratório é afastado do LAQUA, ficando a aproximadamente 1,5 km. Esse transporte pode alterar as condições ideais para desenvolvimento da levedura	A placa apresentou contaminação, mas as curvas apresentaram coloração mais intensa.	Suspeitou-se que o extrato poderia estar causando atividade estrogênica e, por esse motivo, o procedimento de limpeza foi alterado

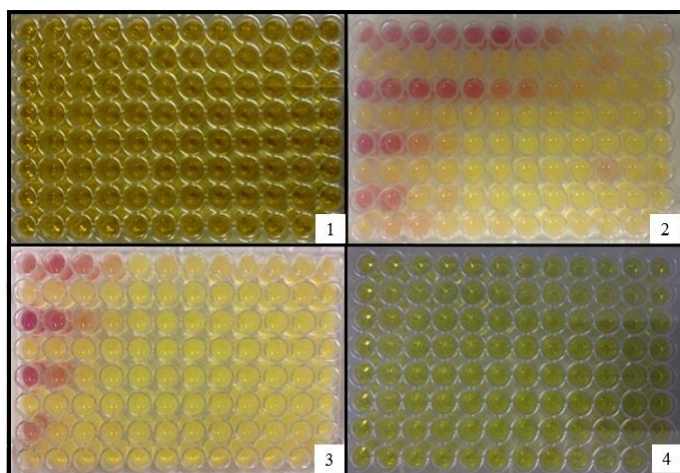
**Tabela 2** – Resumo dos problemas e procedimentos com as leveduras no LAQUA. (Continuação)

<p><b>01/11/2016</b> <b>(Figura 7.7)</b></p>	<p>Pela primeira vez foi identificado problema de crescimento da levedura através da leitura da absorbância a 620 nm. O valor obtido foi de 0,6. Mesmo assim o teste foi realizado utilizando-se uma quantidade maior de levedura (35 µL)</p>	<p>A placa inteira não apresentou mudança na coloração</p>	<p>Esse resultando indicou problemas com o crescimento da levedura</p>
<p><b>04/11/2016</b> <b>(Figura 7.8)</b></p>	<p>Foi descongelada uma nova linhagem de acordo com o protocolo de Routledger &amp; Sumpter (1996). No dia do teste a leitura de absorbância foi igual a 0,846, dentro da faixa esperada</p>	<p>O ensaio apresentou resultados bastante satisfatórios, apresentando pouquíssimos pontos de contaminação</p>	
<p><b>11/11/2016 a 25/11/2016</b> <b>(Figura 9.1)</b></p>	<p>Após esse resultado positivo, o procedimento foi repetido, mas a leitura da faixa de absorbância encontrou-se sempre abaixo do esperado</p>	<p>As placas não apresentaram mudança na coloração ou apresentaram colorações pouco intensas</p>	<p>Esse resultado indicou problema no crescimento da levedura</p>
<p><b>28/11/2016</b> <b>(Figura 9.2 e 9.3)</b></p>	<p>Foi obtida uma nova levedura, desta vez do Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ. Essa levedura também apresentou problemas no crescimento</p>	<p>As placas não apresentaram mudança na coloração ou apresentaram colorações pouco intensas</p>	<p>Esse problema foi relacionado à data de congelamento da levedura, que ultrapassava 4 meses, e ao fato de que a levedura, que deveria estar congelada, estava no estado líquido, apenas resfriada</p>
<p><b>Demais testes até dia 19/12/2016</b> <b>(Figura 9.4)</b></p>	<p>A partir disso, todos os ensaios realizados com as linhagens da UFV e da UERJ apresentaram valor de absorbância abaixo do esperado</p>	<p>A resposta de alteração de cor foi menor do que a esperada ou inexistente</p>	<p>Hipótese de que havia problema relacionado com o protocolo de manutenção da linhagem ou com algum reagente utilizado no meio de cultivo</p>

Dentre as possíveis causas para o atraso no desenvolvimento da levedura destacam-se erros na propagação e cultivo da linhagem ou problema com algum reagente que compõe as soluções do meio de cultivo. Afim de eliminar os possíveis problemas, está sendo providenciada a obtenção da centrífuga para evitar o transporte da levedura e será realizada a compra de novos reagentes que compõe o meio de cultivo da levedura. Além disso, será



realizado um novo treinamento no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFV visando a completa implementação do ensaio no LAQUA.



**Figura 9** – Resultados de alguns ensaios YES realizados a partir do dia 11/11/2016.

As imagens dos ensaios realizados a partir do dia 11/11/2016 com as amostras que foram submetidas à cloração são identificadas na Figura 9. Observa-se que o desenvolvimento da levedura ficou comprometido, e por esse motivo as placas apresentaram coloração amarela ou alteração de cor menos intensa do que a esperada, não sendo possível calcular a concentração da atividade estrogênica.

### 3.6 Resultados dos ensaios de cloração

Os resultados das análises realizadas antes e depois dos ensaios de cloração são apresentados na Tabela 3. Os valores correspondem à média dos valores das duplicatas.

**Tabela 3** - Resultados obtidos nos ensaios de cloração com dose de cloro igual a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>.

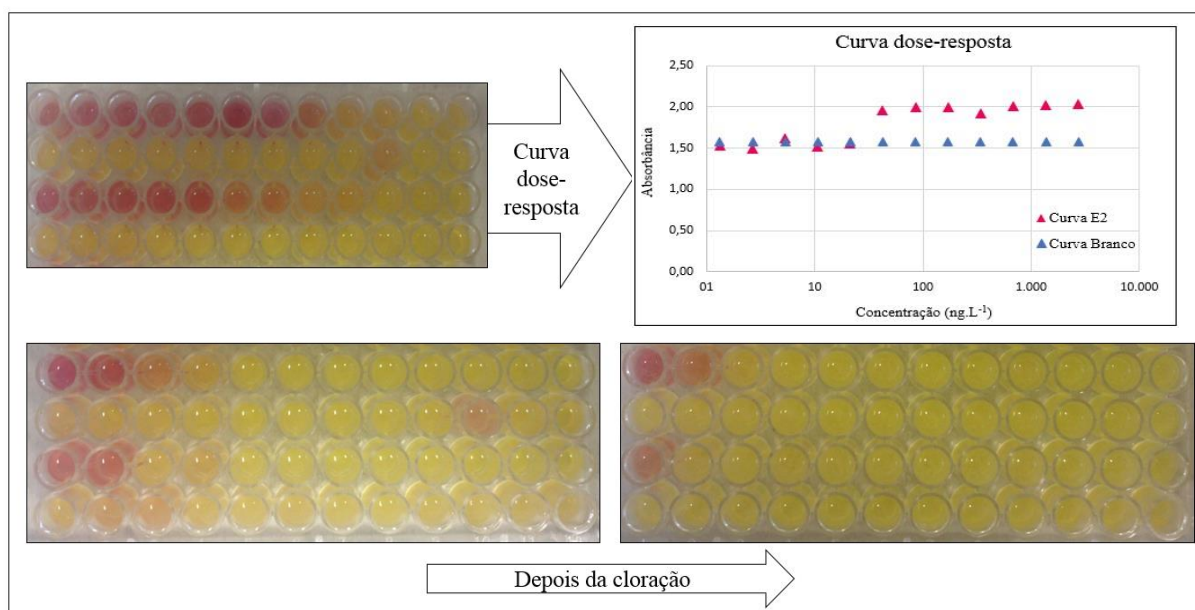
Parâmetros	Antes da cloração	Depois da cloração (1 minuto)	Depois da cloração (30 minutos)
pH	6,85	7,09	6,99
Cor (uC)	10,3	10,5	10,1
Condutividade (µs.cm <sup>-1</sup> )	19,34	21,6	20,85
Turbidez (ut)	0,89	0,84	0,91
Temperatura (°C)	26	26	26
Cloro livre (mg.L <sup>-1</sup> )	-	0,42	0,25
Cloro total (mg.L <sup>-1</sup> )	-	0,49	0,37

Os parâmetros avaliados não sofreram grandes alterações após a cloração. Esse resultado é esperado uma vez que a matriz analisada apresenta baixa demanda de cloro. Por esse mesmo motivo observa-se que não houve um grande consumo de cloro (FISCHER, 2013; PEREIRA, 2011).

A partir disso, foram realizados os ensaios de estrogenicidade nas amostras de água de estudo com 17β-estradiol antes e depois da cloração com os dois diferentes tempos de contato. Porém, ao analisar os resultados do ensaio YES na remoção da atividade estrogênica o ensaio não apresentou os requisitos necessários para que fossem calculados os valores da amostra.

Foram realizados vários ensaios com essas amostras, porém os resultados não foram satisfatórios. As placas ficaram amarelas ou apresentaram mudança de cor menos intensa do que a esperada. Porém, resultados obtidos para o tratamento com tempo de contato igual a 1

minuto e dose de cloro  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  apresentaram um indicativo da redução da atividade estrogênica, apesar de não ser possível construir a curva dose-resposta de acordo com o apresentado na literatura e assim não ser possível obter o valor do  $EC_{50}$  utilizado nos cálculos das concentrações (Figura 10).



**Figura 10** – Ensaio YES para amostra submetida à cloração utilizando dose de cloro igual a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e tempo de contato igual a 1 minuto. No esquema, as linhas da curva em duplicata que é utilizada para os cálculos da curva dose-resposta e a amostra de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  antes e depois da cloração.

Percebe-se que a cloração proporciona um efeito positivo na remoção da atividade estrogênica da amostra, apesar de não ser possível quantificá-lo. Resultados semelhantes foram obtidos por Fischer (2013), porém estudos complementares devem ser realizados para identificar e quantificar o potencial de oxidação com o cloro das substâncias desreguladores endócrinas. Embora o ensaio YES seja eficiente na determinação de estrogenicidade, a quantificação dos estrogênios complementa tais resultados. Além disso, a quantificação e ensaios *in vivo* devem ser realizados conjuntamente, inclusive na identificação de subprodutos que possam causar atividade estrogênica.

Pereira (2011) também identificou o efeito positivo da cloração na remoção do E2, alcançando 50% de remoção para concentração de E2 e dose de cloro iguais ao do ensaio realizado, utilizando tempo de contato igual a 10 minutos e 70% para tempo de contato igual a 30 minutos.

Como o ensaio YES identifica a atividade estrogênica inerente ao E2 remanescente e a todos os seus subprodutos que também causem atividade estrogênica, a atividade estrogênica poderia aumentar após a cloração. Lee *et al.* (2004), porém, identificou que o cloro é um agente ativo na eliminação da atividade estrogênica do E2, sendo eficientemente removida com o aumento do tempo de contato.

#### 4. CONCLUSÃO

As concentrações de  $17\beta$ -estradiol nas diversas matrizes ambientais variam na ordem de  $\text{ng.L}^{-1}$  e  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em âmbito nacional e internacional, sendo estas concentrações superiores



no Brasil em comparação aos outros países. No Brasil os estudos ainda são incipientes, porém destaca-se a identificação de E2 nas águas tratadas, com mediana igual a 5,14 ng.L<sup>-1</sup>. Observa-se que o processo de cloração é eficiente na remoção de E2, possuindo remoções mais elevadas com tempo de contato igual ou superior a 30 minutos.

Durante a implementação do ensaio de atividade estrogênica foram identificados diversos problemas, sendo o principal deles relacionado com o crescimento da levedura. Apesar de algumas condições não terem sido atendidas, foi observado que a cloração apresentou um efeito positivo na redução da atividade estrogênica da amostra submetida à cloração com tempo de contato igual a 1 minuto. Entretanto, como a quantificação não foi possível, sendo assim recomenda-se que estudos adicionais sejam realizados utilizando outras técnicas de análise.

## 5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pelo financiamento do projeto e bolsas e a todas as agências brasileiras que financiaram projetos de autores nessa área de pesquisa. Ao Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Viçosa, em especial às professoras Ann Mounteer, Déborah Magalhães e a doutoranda Natália Rezende, ao Laboratório de Ecologia e ao Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microorganismos da Universidade Federal de Juiz de Fora, em especial à professora Dionéia Evangelista e ao Laboratório de Engenharia Sanitária da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, em especial à professora Daniele Bila, por toda disponibilidade. À técnica Iramaia pelo apoio em todas as horas. Às professoras Renata Pereira e Sue Ellen Bottrel, por todo ensinamento transmitido. Aos amigos Thamara e João e a todos que apoiaram de alguma forma.

## 6. REFERÊNCIAS

ALUM, A.; YOON, Y.; WESTERHOPFF, P.; ABBASZADEGAN, M. Oxidation of Bisphenol A, 17 $\beta$ -Estradiol, and 17 $\alpha$ -Ethinyl Estradiol and Byproduct Estrogenicity. *Environmental Toxicology*, v.19, p.257-264, 2004.

ANDRÁSI, N.; MOLNÁR, B.; DOBOS, B.; VASANITS-ZSIGRAI, A.; ZÁRAY, G.; MOLNÁR-PERL, I. Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. *Talanta*, v.115, n., p. 367–373, 2013.

AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013.

ARAÚJO, J.C. *Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais*. Dissertação de mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

AVAR, P.; ZRÍNYI, Z.; MAÁSZ, G.; TAKÁTSY, A.; LOVAS, S.; TÓTH, L.G.; PIRGER, Z.  $\beta$ -Estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin. *Environmental Science and Pollution Research*, v.23, n.12, p. 11630–11638, 2016.

- BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology*, v.34, n.24, p. 5059-5066, 2000.
- 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 A*, v.1090, n.1-2, p. 98-106, 2005.
- BEHERA, S. K.; KIM, H. W.; OH, J. E.; PARK, H. S. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of the Total Environment*, v.409, n.20, p. 4351-4360, 2011.
- BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHFER, A. J.; RIJS, G. B. J.; WEGENER, J., COFINO, W. P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, v.225, n.1-2, p.101-108, 1999
- BIGNERT, A.; DANIELSSON, S.; FAXNELD, S.; MILLER, A.; NYBERG, E. Comments concerning the National Swedish Contaminant Monitoring Program in Marine Biota. Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 2013.
- BILA, D. M. *Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β -estradiol pelo processo de ozonização*. Tese de doutorado em Ciências em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2005.
- BRANDT, E.M.F. *Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (reatores UASB seguidos de pós-tratamento)*. Dissertação de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M.; LLOMPART, M.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, I.; GÓMEZ, M.; TERNES, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, v.38, p. 2918-2926, 2004.
- CARGOUËT, M.; PERDIZ, D.; MOUATASSIM-SOUALI, A.; TAMISIER-KAROLAK, S.; LEVI, Y. Assessment of River Contamination by Estrogenic Compounds in Paris Area (France). *Science of the Total Environment*, v.324, n.1-3, p.55-66, 2004.
- CHEN, C.Y.; WEN, T.Y.; WANG, G.S.; CHENG, H.W.; LIN, Y.H.; LIEN, G.W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, v.378, n.3, p.352-365, 2007.
- CUNHA, I.N.; AGUILA, K.S. Avaliação da presença hormônios no manancial de abastecimento João Leite em Goiânia-GO. In: *28º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2005, Rio de Janeiro.
- DEBORDE, M.; RABOUAN, S.; DUGUET, J.P.; LEGUBE, B. Kinetics of aqueous ozone-induced oxidation of some endocrine disruptors. *Environmental science and technology*, v.39, n.16, p. 6086-6092, 2005.
- DESBROW, C., ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., et al. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science Technology*, v. 32, n. 11, p. 1549-1558, 1998.
- DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology*, v.32, n.11, p. 1549-1558, 1998.
- DIAS, R.V.A.; SANSON, A.L.; AFONSO, R.J.C.F.; AQUINO, S.F.; PADUA, V.L. Avaliação da ocorrência de fármacos e interferentes endócrinos em sistema de abastecimento de água na região metropolitana de Belo Horizonte. In: *28º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2015, Rio de Janeiro.
- DORABAWILA, N.; GUPTA, G. Endocrine disrupter estradiol in Chesapeake Bay tributaries, *Journal of hazardous materials*, v.120, n.1, p.67-71, 2005.

- FARRÉ, M.; KUSTER, M.; BRIX, R.; RUBIO, F.; ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *Journal of Chromatography A*, v.1160, n.1-2, p.166–175, 2007.
- FERNANDEZ, M. P.; IKONOMOU, M. G.; BUCHANAN, I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters, *Science of the Total Environment*, v.373, p.250-269, 2007.
- FILHO, R.W.R. *Hormônios estrógenos no Rio do Monjolinho, São Carlos - SP: uma avaliação da problemática dos desreguladores endócrinos ambientais*. Tese de Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- FISCHER, N. *Cloração da água com 17 $\beta$ -estradiol e utilização do teste YES para avaliação da estrogenicidade*. Dissertação de mestrado em Ciências em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2013.
- FORREZ, I.; CARBALLA, M.; NOPPE, H.; DE BRABANDER, H.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Influence of manganese and ammonium oxidation on the removal of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). *Water Research*, v.43, p.77–86, 2009.
- FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 16, n. 5, p. 593-603, 2009.
- FROEHNER, S.; PICCIONI, W.; MACHADO, K.S.; AISSE, M.M. Removal capacity of caffeine, hormones, and bisphenol by aerobic and anaerobic sewage treatment. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 216, n.1-4, p. 463-471, 2011.
- FURUICHI, T.; KANNAN, K.; GIESY, J. P.; AND MASUNAGA, S. Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and in vitro reporter gene assay. *Water Research*, v.38, n.20, p.4491-4501, 2004.
- GEROLIN, E.R.R. *Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré - São Paulo*. Tese de Doutorado em Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- GHISELLI, G. *Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- GIBSON, R.; BECERRIL-BRAVO, E.; SILVA-CASTRO, V.; JIMENEZ, B. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1169, n.1-2, p.31–39, 2007.
- GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1295, p.57–66, 2013.
- HAMILTON, L.A.; TREMBLAY, L.A.; NORTHCOTT, G.L.; BOAKE, M.; LIM, R.P. The impact of variations of influent loading on the efficacy of an advanced tertiary sewage treatment plant to remove endocrine disrupting chemicals. *Science of the Total Environment*, v.560–561, p.101–109, 2016.
- HASHIMOTO, T.; ONDA, K.; NAKAMURA, Y.; TADA, K.; MIYA, A.; MURAKAMI, T. Comparison of natural estrogen removal efficiency in the conventional activated sludge process and the oxidation ditch process. *Water Research*, v.41, n.10, p.2117-2126, 2007.
- HOHENBLUM, P.; GANS, O.; MOCHE, W.; SCHARF, S.; LORBEER, G. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Science of the Total Environment*, v.333, n.1-3, p.185-193, 2004.

HU, J.; ZHANG, H.; CHANG, H. Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1070, n.1-2, p.221–224, 2005.

HUANG, B.; LI, X.; SUN, W.; REN, D.; LI, X.; LI, X.; LIU, Y.; LI, Q.; PAN, X. Occurrence, removal, and fate of progesterones, androgens, estrogens, and phenols in six sewage treatment plants around Dianchi Lake in China. *Environmental Science and Pollution Research*, v.21, p.12898-12908, 2014.

IFELEBUEGU, A.O.; UKPEBOR, J.E.; OBIDIEGWU, C.C.; KWOFI, B.C. Comparative potential of black tea leaves waste to granular activated carbon in adsorption of endocrine disrupting compounds from aqueous solution. *Global Journal of Environmental Science and Management*, v.1, n.3, p.205-214, 2015.

ISMAIL, A.; SYAIZWAN, Z.Z.; USUKI, Y.; KITAJIMA, S.; ARIZONO, K. The level of 17 $\beta$ -estradiol in aquatic environments around Klang Valley. *Malaysian Applied Biology Journal*, v.36, n.1, p. 85–87, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Pesquisa Nacional de Saneamento Básico*. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[https://observatoriopnrs.files.wordpress.com/2014/12/pnsb\\_ibge-2008-2010.pdf](https://observatoriopnrs.files.wordpress.com/2014/12/pnsb_ibge-2008-2010.pdf)> Acessado em: 20 de setembro de 2016.

ISOBE, T.; NISHIYAMA, H.; NAKASHIMA, A.; TAKADA, H. Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentar distributions. *Environmental Science and Technology*, v.35, n.6, p.1041–1049, 2001.

JIANG, J. Q.; YIN, Q.; JOU, J.L.; PEARCE, P. Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters. *Chemosphere*, v.61, n.4, p. 544-550, 2005.

JIANG, W.; YAN, Y.; MA, M.; WANG, D.; LUO, Q.; WANG, Z.; SATYANARAYANAN, S. K. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China. *Journal of Environmental Sciences*, v.24, n.2, p.320–328, 2012.

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

KARNJANAPIBOONWONG, A.; SUSKI, J. G.; SHAH, A. A.; CAI, Q.; MORSE, A. N.; ANDERSON, T. A. Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water, Air & Soil Pollution*, v.216, n.1, p.257-273, 2011.

KIM, S.D.; CHO, J.; KIM, I.S.; VANDERFORD, B.J.; SHANE A. SNYDER, S.A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste Waters. *Water Research*, v.41, n.5, p.1013–1021, 2007.

KLINGELHOFER, I.; MORLOCK, G.E. Bioprofiling of Surface/Wastewater and Bioquantitation of Discovered Endocrine-Active Compounds by Streamlined Direct Bioautography. *Analytical Chemistry*, v.87, n.21, p.11098–11104, 2015.

KOLOK, A. S.; SNOW, D. D.; KOHNO, S.; SELLIN, M. K.; GUILLETTE, J.L. J. Occurrence and biological effect of exogenous steroids in the Elkhorn river, Nebraska, USA. *Science of the Total Environment*, v.388, n.1-3, p.104-115, 2007.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S Streams, 1999 – 2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, v.36, n.6, p.1202–1211, 2002.

KUCH, H.M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCD)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science & Technology*, v.35, n.15, p.3201–3206, 2001.

LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; DE LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural Waters. *Analytica Chimica Acta*, v.501, n.1, p.79–88, 2004.

LARSSON, D. G. J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKINEN, J.; PETERSSON, M.; BERG, A. H.; OLSSON, P. E., FORLIN, L. Ethinylestradiol — an undesired fish contraceptive. *Aquatic Toxicology*, v.45, 1999.

LEE, B. C.; KAMATAB, M.; AKATSUKAC, Y.; TAKEDAA, M.; OHNOA, K.; KAMEIA, T.; MAGARRA, Y. Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Research*, v.38, p. 733-739, 2004.

LEE, H. B.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1094, n.1, p.122-129, 2005.

LISCIO, C.; MAGI, E.; DI CARRO, M.; SUTER, M. F.; VERMEIRSEN, E. L. M. Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses. *Environmental pollution*, v.157, n.10, p.2716-2721, 2009.

LIU, N.; SHI, Y.; LI, M.; ZHANG, T.; GAO, S. Simultaneous determination of four trace estrogens in feces, leachate, tap and groundwater using solid–liquid extraction/auto solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, v.38, n.20, p.3494-3501, 2015.

LIU, R.; ZHOU, J.L.; WILDING, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1022, n.1-2, p.179–189, 2004.

LOPES, L.G. *Estudo sobre a ocorrência de estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – SP*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MARTIN, J.; CAMACHO-MUNOZ, D.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, v.239, p.40-47, 2012.

MATSUMOTO, K.; TSUKAHARA, Y.; UEMURA, T.; TSUNODA, K.; KUME, H.; KAWASAKI, S.; TADANO, J.; MATSUYA, T. Highly sensitive time-resolved fluorometric determination of estrogens by high-performance liquid chromatography using a  $\beta$ -diketonate europium chelate. *Journal of Chromatography B*, v.773, n.2, p.135–142, 2002.

MIBU, K.; WADA, J.; OKAYASU, Y.; TSUMORI, J.; KOMORI, K.; TANAKA, H.; LI, J.H.; SASAKI, M.; SATO, C. Distribution of estrogen, nonylphenol and its derivatives in the sediments of a shallow lake. *Water Science and Technology*, v.50, n.5, p.173–179, 2004.

MOL, H.G.J.; SUNARTO, S.; STEIJGER, O.M. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v.879, n.1, p.97-112, 2000.

MOREIRA, D.S.; AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. C. F.; SANTOS, E. P. P. C.; PÁDUA, V.L. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. *Environmental Technology*, v.30, n.10, p.1041-1049, 2009.

MOREIRA, M.A.; AQUINO, S.F.; COUTRIM, M.X.; SILVA, J.C.C.; AFONSO, R.J.C.F. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESILC-IT-TOF/MS). *Environmental Technology*, v.32, n.11-12, p.1409-1417, 2011.

MULLER, M.; RABENOELINA, F.; BALAGUER, P.; PATUREAU, D.; LEMENACH, K.; BUDZINSKI, H.; BARCELO, D.; LOPEZ DE ALDA, M.; KUSTER, M.; DELGENES, J. P.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, p.1649-1658, 2008.

- NAKADA, N.; TANISHIMA, T.; SHINOHARA, H.; KIRI, K.; TAKADA, H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research*, v.40, p.3297-3303, 2006.
- NIE, Y.; QIANG, Z.; ZHANG, H.; BEN, W. Fate and seasonal variation of endocrine disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A/A/O process. *Separation and purification technology*, v.84, p. 9-15, 2012.
- PAILLER, J. Y.; KREIN, A.; PFISTER, L.; HOFFMANN, L.; GUIGNARD, C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*, v.407, n.16, p.4736-4743, 2009.
- PAWLOWSKI, S.; TERNES, T. A.; BONERZ, M.; RASTALL, A. C.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*, v.18, n.1, p.129-138, 2004.
- PEREIRA, R.O. *Formação de subprodutos do estrona e 17 $\beta$ -estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água*. 2011. 192p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- PEREIRA, R.O.; POSTIGO, C.; de ALDA, M.L.; DANIEL, L.A.; BARCELÓ, D. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, v.82, n.6, p.789-799, 2011.
- PESSOA, G. P.; SOUZA, N. C.; VIDAL, C. B.; ALVES, J. A.; FIRMINO, P. I. M.; NASCIMENTO, R. F.; SANTOS, A. B. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, v.490, p.288-295, 2014.
- PESSOA, G.P.; SOUZA, N.C.; ALVES, J.A.C.; NASCIMENTO, R.F.; SANTOS, A.B. Análise de remoção de interferentes endócrinos em estações de tratamento de esgotos sanitários. In: *26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2011.
- POJANA, G.; GOMIERO, A.; JONKERS, N.; MARCOMINI, A. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, v.33, n.7, p.929-936, 2007. QUINTANA ET AL 2004
- RA, J.; LEE, S.; LEE, J.; KIM, H. Y.; LIM, B. J.; KIM, S. H.; KIM, S. D. Occurrence of estrogenic chemicals in South Korean surface waters and municipal wastewaters. *Journal of Environmental Monitoring*, v.13, n.1, p.101-109, 2011.
- RAIMUNDO, C.C.M. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do Rio Atibaia*. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- ROCHA, S.; DOMINGUES, V. F.; PINHO, C.; FERNANDES, V. C.; DELERUE-MATOS, C.; GAMEIRO, P.; MANSILHA, C. Occurrence of bisphenol A, estrone, 17 beta-estradiol and 17 alphaethinylestradiol in Portuguese rivers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.90, n.1, p.73-78, 2013.
- ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.
- SALGADO, R.; MARQUES, R.; NORONHA, J.P.; CARVALHO, G.; OEHMEN, A.; REIS, M.A. Assessing the removal of pharmaceuticals and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environmental Science and Pollution Research*, v.19, p.1818-1827, 2012.
- SERVOS, M. R.; BENNIE, D.T.; BURNISON, B.K.; JURKOVIC, A. Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, v. 336, n.1, p. 155-170, 2005.

- SNYDER, S.A. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental Science & Technology*, v.33, n.16, p.2814-2820, 1999.
- SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A.F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.2, n.2, p.187-196, 2007.
- SODRÉ, F.F.; PESCARA, I.C.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v.96, n.1, p.92–98, 2010.
- SOLÉ, M.; ALDA, M.J.L.; CASTILLO, M.; PORTE, C.; LADEGAARD-PEDERSEN K.; BARCELÓ, D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain), *Environmental Science and Technology*. v.34, n.24, p.5076–5083, 2000.
- SOUZA, J.B.G. *Estudo da ocorrência de tetraciclínas e estrógenos em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de Campo Grande (MS)*. Tese de Doutorado em Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- SOUZA, N.C. *Avaliação de Micropoluentes Emergentes em Esgotos e Águas Superficiais*. Tese em Doutorado em Engenharia Civil. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.
- SUN, J.; JI, X.; ZHANG, R.; HUANG, Y.; LIANG, Y.; DU, J.; XIE, X.; LI, A. Endocrine disrupting compounds reduction and water quality improvement in reclaimed municipal wastewater: A field-scale study along Jialu River in North China. *Chemosphere*, v.157, p.232-240, 2016.
- TAN, B. L.; HAWKER, D. W.; MEULLER, J. F.; LEUSCH, F. D.; TREMBLAY, L. A.; CHAPMAN, H. F. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environment International*, v.33, p.654-669, 2007.
- 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, n.1-2, p.81-90, 1999.
- THOMPSON, M.L.; CASEY, F.X.M.; KHAN, E.; HAKK, H.; LARSEN, G.L.; DESUTTER, T. Occurrence and pathways of manure-borne 17 $\beta$ -estradiol in vadose zone water. *Chemosphere*, v.76, n.4, p.472–479, 2009.
- TORRES, N.H. *Determinação de hormônios e antimicrobianos no Rio Piracicaba e testes de toxicidade aguda com Daphnia magna*. Tese de Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- TORRES, N.H.; AGUIAR, M.M.; FERREIRA, L.F.R.; AMÉRICO, J.H.P.; MACHADO, A.M.; CAVALCANTI, E.B.; TORNISIELO, V.L. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.187, n.6, p.379, 2015.
- TRUTER, J.C.; WYK, J. H.; OBERHOLSTER, P.J.; BOTHA, A.M.; KLERK, A.R. An In Vitro and In Vivo Assessment of Endocrine Disruptive Activity in a Major South African River. *Water, Air Soil Pollution*, v.227, n.2, p.54, 2016.
- VERSTRAETEN, I. M.; HEBERER, T.; VOGEL, J. R.; SPETH, T.; ZUEHLKE, S.; DUENNBIEER, U. Occurrence of endocrine disrupting and other wastewater compounds during water treatment with case studies from Lincoln, Nebraska and Berlin, Germany. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, v.7, p.253-263, 2003.
- VETHAAK, A. D.; LAHR, J.; SCHRAP, S.M.; BELFROID, A. C.; RIJS, G. B. J.; GERRITSEN, A.; DE BOER, J.; BULDER, A. S.; GRINWIS, G. C.M.; KUIPER, R. V.; LEGLER, J.; MURK, T. A. J.; PEIJNENBURG, W.; VERHAAR, H. J. M.; DE VOOGT, P. An integrated assessment of estrogenic

contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, v.59, n.4, p.511–524, 2005.

VIGANÒ, L.; BENFENATI, E.; VAN CAUWENBERGE, A.; EIDEM, J.K.; ERRATICO, C.; GOKSØYR, A.; KLOAS, W.; MAGGIONI, S.; MANDICH, A.; URBATZKA, R. Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. *Chemosphere*, v.73, n.7, p.1078–1089, 2008.

VIGLINO, L.; ABOULFADL, K.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta*, v.76, n.5, p.1088–1096, 2008.

VULLIET, E.; OLIVÉ, C.C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and ground waters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, v.159, n.10, p.2929–2934, 2011.

VULLIET, E.; WIEST, L.; BAUDOT, R.; LOUSTALOT, M.F.G. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1210, n.1, p.84–91, 2008.

WESTERHOFF, P.; YOO N, Y.; SNYDER, S.; WERT, E. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental Science and Technology*, v.39, p.6649–6663, 2005.

WILLIAMS, R.J.; JOHNSON, A.C.; SMITH, J.J.L.; KANDA, R. Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment Works discharges. *Environmental Science and Technology*, v. 37, p.1744–1750, 2003.

WRIGHT-WALTERS, M.; VOLZ, C. Municipal wastewater concentrations of pharmaceutical and xenoestrogens: wildlife and human health implications. In: *3rd National Conference on Science & Technology*, Greensboro, 2007.

XIAO, X.Y.; MCCALLEY, D. V.; MCEVOY, J.; J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, v.923 n.1-2, p.195–204, 2001.

XU, W.; YAN, W.; HUANG, W.; MIAO, L.; ZHONG, L. Endocrine-disrupting chemicals in the Pearl River Delta and coastal environment: sources, transfer, and implications. *Environmental Geochemistry and Health*, v.36, n.6, p.1095–1104, 2014.

YANG, L.; LUAN, T.; LAN, C. Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1104, n.1-2, p.23–32, 2006.

YANG, Y.; CAO, X.; ZHANG, M.; WANG, J. Occurrence and distribution of endocrine-disrupting compounds in the Honghu Lake and East Dongting Lake along the Central Yangtze River, China. *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, n.22, p.17644–17652, 2015.

YING, G.G.; KOOKANA, R.S.; KUMAR, A.; MORTIMER, M. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. *Science of the Total Environment*, v.407, n.18, p.5147–5155, 2009.

ZORITA, S.; MÅRTENSSON, L.; MATHIASSEN, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the total environment*, v.407, n.8, p.2760–2770, 2009.

ZUO, Y.; ZHANG, K.; DENG, Y. Occurrence and photochemical degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Acushnet River Estuary. *Chemosphere*, v.63, n.9, p.1583–1590, 2006.