

II-288 - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS APÓS TRATAMENTO SECUNDÁRIO

Julyenne Meneghetti Campos⁽¹⁾

Tecnóloga em Saneamento Ambiental pela Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (FT/UNICAMP). Mestre em Engenharia Agrícola pela Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI/UNICAMP). Doutoranda em Engenharia Agrícola pela FEAGRI/UNICAMP.

Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz⁽²⁾

Pesquisadora no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP.

Denis Miguel Roston⁽³⁾

Professor livre-docente do Departamento de Água e Solos da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, FEAGRI/UNICAMP.

Endereço⁽¹⁾: Av. Cândido Rondon, n.º 501, Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Barão Geraldo - Campinas - SP - CEP: 13083-875 - Brasil - Tel: +55 (19) 3521-1029 - e-mail: julyenne.mc@gmail.com.

RESUMO

Interferentes endócrinos são substâncias que estão cada vez mais presentes no meio ambiente, especialmente nos corpos hídricos, que podem causar câncer em seres humanos e animais, mutagenicidade nos órgãos reprodutores das espécies animais presentes na biota aquática, esterilidade em homens, entre outros efeitos adversos à saúde. *Constructed wetlands* são métodos alternativos de tratamento de água e efluentes, que se baseiam na retirada de poluentes pelas macrófitas aquáticas e pelo biofilme formado nas raízes das plantas fixadas ao meio suporte, simulando assim os sistemas naturais de tratamento. Eles têm como vantagem o baixo custo de implantação e manutenção, economia de energia elétrica durante seu funcionamento, além de serem eficientes na remoção de poluentes. *Constructed wetlands* foram citados como um eficiente método de remoção de pesticidas levemente hidrofóbicos. Neste contexto, devido ao fato de estrogênios serem substâncias levemente hidrofóbicas, o presente trabalho visou desenvolver e validar uma metodologia de análise cromatográfica para determinação quantitativa dos hormônios etinilestradiol (EE2) e levonorgestrel (LEV), e do composto químico bisfenol A (BPA) em águas residuárias após tratamento secundário, com o intuito de analisar esses compostos no afluente e efluente de uma *wetland* construída em escala laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE: Cromatografia líquida, *wetlands* construídas, mini-papiro, hormônios, bisfenol A.

INTRODUÇÃO

A incidência de várias doenças na população têm crescido atualmente, e um dos fatores que contribuem para isso é o aumento da exposição à diversas substâncias químicas presentes no meio ambiente como fármacos, pesticidas, herbicidas, antibióticos, produtos de higiene pessoal - que são substâncias indispensáveis à saúde humana e ao desenvolvimento industrial, mas que em elevadas concentrações podem causar alteração no sistema endócrino de seres vivos, e por isso são chamados interferentes endócrinos (IOMC, 2012).

A contaminação por interferentes endócrinos pode ser feita por fontes pontuais, como o lançamento de águas residuárias *in natura* ou mesmo tratadas, tendo em vista que as Estações de Tratamento de Esgoto não são capazes de remover totalmente essas substâncias, ou por fontes difusas como aplicação de pesticidas em culturas, ou ainda disposição de lodo e águas residuárias no solo (KOOKANA et al., 2007).

Em 2010, Hijosa-Valseiro et al. compararam o tratamento de águas residuárias por diversas configurações de *wetlands* e com diferentes macrófitas, simultaneamente ao tratamento da mesma água residuária em uma estação de tratamento convencional. Os autores relataram que a ETE não foi capaz de remover diclofenaco, carbamazepina, galaxolide e tonalide, enquanto que as *wetlands* removeram todas essas substâncias, em maiores ou menores quantidades. Isso evidencia que *wetlands* foram mais eficientes no tratamento de interferentes endócrinos do que o tratamento convencional em ETE.

Pelo fato de não existir um método oficial para avaliação e identificação de interferentes endócrinos em águas residuárias, ao utilizar e adaptar a metodologia não normalizada de outros autores, é necessário validar esta metodologia analítica. A validação de um método analítico se faz necessária para demonstrar por meio de estudos experimentais, que os métodos de um ensaio químico assegurará a confiabilidade dos resultados, nas condições que este está sendo realizado, e também que o método é adequado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Os métodos cromatográficos mais utilizados para identificação e quantificação de interferentes endócrinos em matrizes ambientais são cromatografia líquida ou gasosa, acoplada a diversos detectores como UV (ultravioleta), DAD (detector de arranjo de diodos - ultravioleta), FL (fluorescência), PID (photoionization detector), FID (flame ionization detector), MS (espectrômetro de massas, ou mass spectrometer), dentre outros. O detector mais sensível e seletivo para análise de estrogênios é o MS, tanto acoplado à cromatografia líquida quanto gasosa, no entanto é um equipamento de alto custo de aquisição e manutenção, e por isso muitos dos laboratórios não possuem cromatógrafos com este tipo de detector.

Um equipamento de menor custo que o MS e encontrado com mais frequência nos laboratórios de análises químicas, ambientais e de alimentos é o HPLC (do inglês, *high performance liquid chromatography*, ou cromatógrafo líquido de alta eficiência) acoplado a detector UV ou DAD. Bernadelli (2014), Campos (2014), Fernandes et al. (2011), Montagner e Jardim (2011) e Torres (2009) utilizaram para análise HPLC-DAD, e Froehner et al. (2011) utilizou para análises de estrogênios HPLC-UV, todos com prévia extração em fase sólida. Um equipamento de HPLC-UV foi utilizado neste trabalho.

Pelo fato da concentração de interferentes endócrinos serem muito baixas, na faixa de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, os parâmetros de validação que devem ser avaliados (análise de traços) são especificidade e seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e robustez (INMETRO, 2007).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia de análise cromatográfica para determinação quantitativa dos hormônios etinilestradiol (EE2) e levonorgestrel (LEV), e do composto químico bisfenol A (BPA) em águas residuárias após tratamento secundário, com o intuito de analisar esses compostos no afluente e efluente de uma *wetland* construída em escala laboratorial.

METODOLOGIA UTILIZADA

DESCRIÇÃO E ABASTECIMENTO DO SISTEMA DE WETLAND CONSTRUÍDA

O sistema de tratamento está instalado no Laboratório de Hidráulica e Irrigação da Faculdade de Engenharia Agrícola, da Universidade Estadual de Campinas. A *wetland* construída de fluxo subsuperficial foi confeccionada em caixa de polipropileno (PP) com dimensões de 60 x 40 x 32 cm utilizando brita n.º 1 como meio suporte (9,5 a 19,0 mm), cultivada com seis mudas da macrófita *Cyperus isocladius*, mais conhecido como mini-papiro. Um reservatório de 150 L foi utilizado para armazenar a água residuária sintética que simula um esgoto municipal com carga C:N:P de 200:50:8, que foi levada à *wetland* construída por meio de bomba dosadora. Os hormônios foram adicionados ao esgoto sintético por meio de pílulas anticoncepcionais maceradas, já o BPA adicionado possuía pureza de 97% e era da marca Sigma-Aldrich. Os compostos foram adicionados em duas faixas de concentração para verificar se ocorreriam diferenças entre as taxas de retenção das concentrações baixas (20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para EE2 e BPA e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para LEV), e em uma faixa cinco vezes maior – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para EE2 e BPA, e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para LEV (concentrações altas). Na Figura 1 pode-se observar uma representação esquemática de uma unidade do sistema de tratamento, com os pontos de coleta circulado em vermelho.

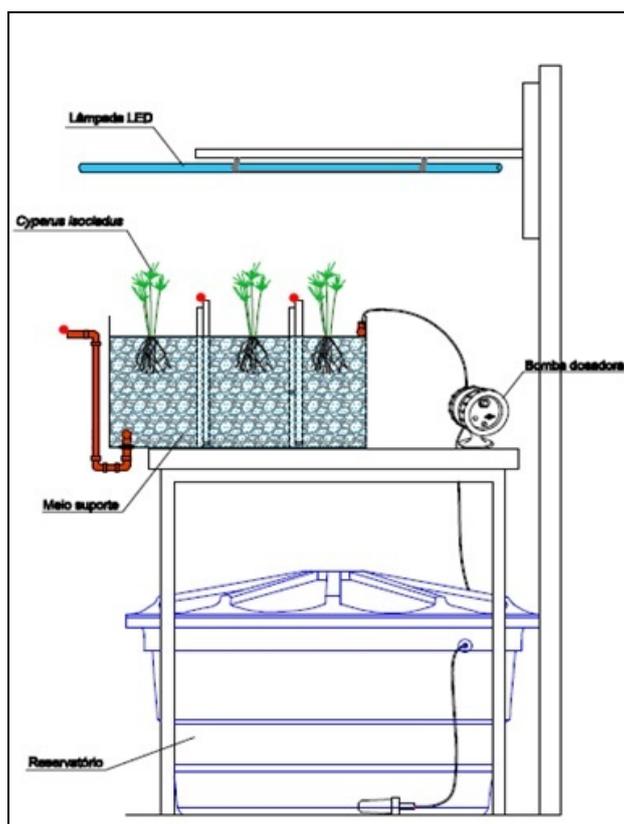


Figura 1: Representação esquemática do sistema de tratamento por *wetland* construída.
Fonte: Figura desenhada por Julyenne M. Campos (2015).

METODOLOGIA DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) - Meio Ambiente. Os padrões cromatográficos de d(-)-norgestrel ($\geq 99\%$), etinilestradiol ($\geq 99,7\%$) e bisfenol A ($\geq 97\%$) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) *Shimadzu Class VP* constituído de sistema de injeção automática, bomba de alta pressão, forno para coluna e detector de ultravioleta (UV) modelo SPD-10AV. A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna C18 da marca *Phenomenex Gemini*, $5\mu\text{m}$, C18, 110 A, $250 \times 4,6 \text{ mm}$.

O método analítico foi adaptado de Santos et al. (2012) e Campos (2014), no qual foi utilizado como fase móvel acetonitrila (grau HPLC) e água ultrapura, obtida de um sistema Milli-Q (modelo Advantage A10, Millipore), na proporção de 50:50, v/v, no modo isocrático. Na mesma corrida foi possível quantificar os três compostos, com fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de fase móvel, volume de injeção de $50 \mu\text{L}$ de amostra, detecção nos comprimentos de onda de 280 nm para BPA e EE2, e 254 nm para LEV.

A etapa de extração em fase sólida (EFS) foi adaptada dos descritos por Raimundo (2007), Campos (2014) e USEPA (2010). Assim, um volume de 500 mL de amostra (de entrada ou saída do sistema), previamente filtradas em filtro de fibra de vidro com diâmetro de poro de $1,2 \mu\text{m}$, foram percoladas em um cartucho de EFS Hypersep™ Retain PEP da marca *Thermo Scientific* (6 mL e 250 mg). Os cartuchos foram ativados com 5 mL de metanol e 7 mL de acetonitrila e condicionados com 5 mL de água ultrapura.

A vazão da amostra no cartucho foi de 1 a $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Após todo o volume passar pelo cartucho, foi realizado um processo de *clean-up* com 10 mL de metanol em água 15% . Os cartuchos foram secos à vácuo por 15 minutos, e os compostos foram eluídos com 5 mL de metanol (grau HPLC) e 5 mL acetonitrila (grau HPLC), o volume final foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico, foi filtrado em filtro de PTFE com $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro, e então injetados no mesmo dia no HPLC. Todas as injeções foram realizadas em triplicata.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A validação do método foi realizada de acordo com o guia “DOQ-CGCRE-008: Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos” do INMETRO (2007), que especifica para análises de elementos traços os seguintes parâmetros para validação: especificidade e seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e robustez.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A especificidade foi avaliada visualmente, comparando um cromatograma da matriz sem os analitos (amostra branca) com um cromatograma da matriz com os analitos (amostra fortificada), com o intuito de verificar se existia alguma substância interferente saindo no mesmo tempo de retenção que os analitos. Conforme mostrado na Figura 2, nenhum interferente foi observado nos tempos de retenção dos analitos.

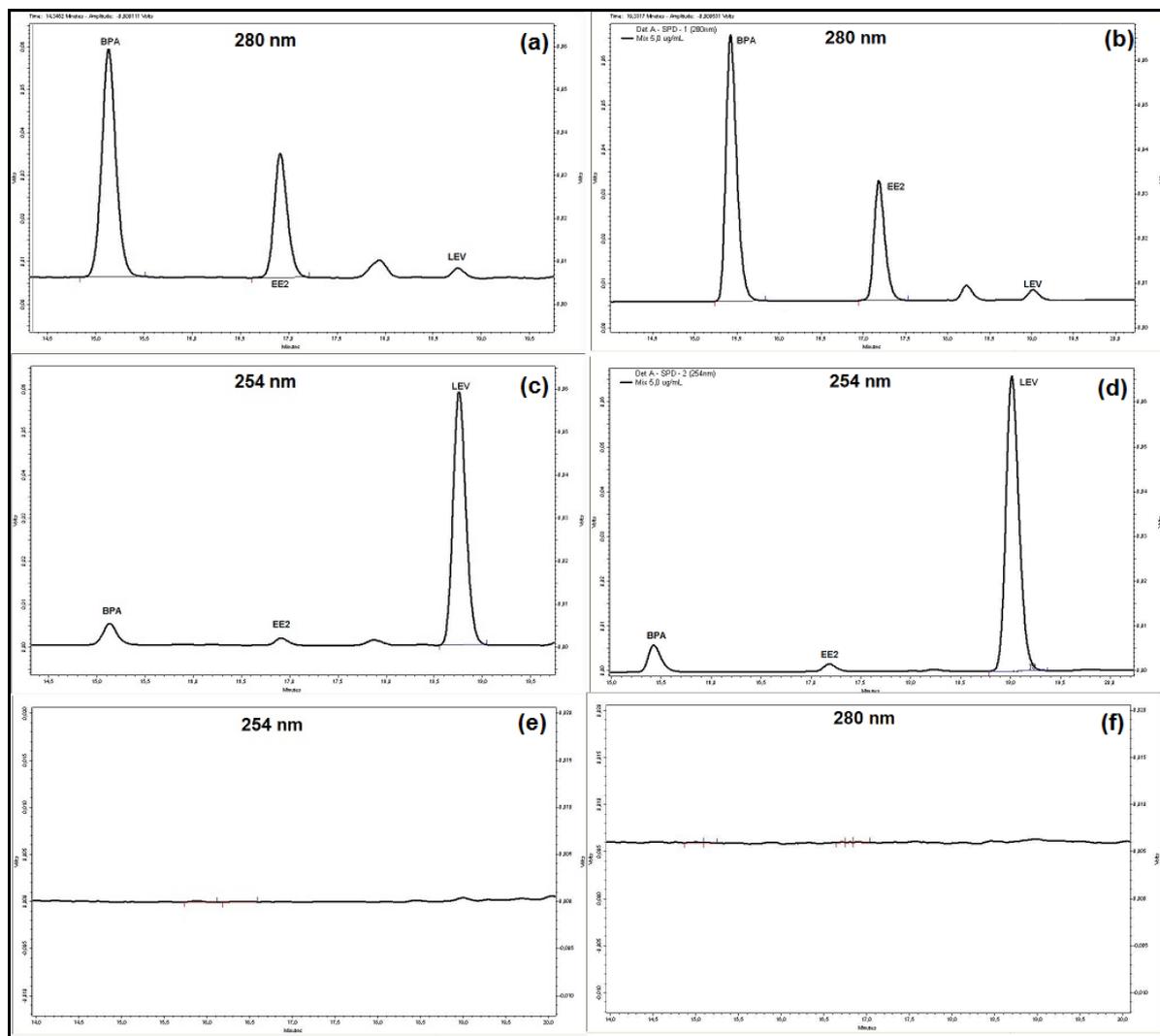


Figura 2: Cromatogramas: a) amostra fortificada BPA e EE2 (280nm), b) padrões BPA e EE2 (280nm). c) amostra fortificada LEV (254nm), d) padrão LEV (254nm), e) amostra branco (254nm), e f) amostra branco (280nm).

Para avaliar o efeito matriz, foram injetadas duas curvas analíticas com diferentes concentrações dos compostos – uma delas diluída na fase móvel e outra diluída no extrato da matriz de esgoto sintético. As duas curvas foram comparadas, e foram aplicados os testes F de homogeneidade de variância e t de Student de

comparação de média, utilizando o *Microsoft Excel*. Após aplicação do Teste *F* observa-se se *F* calculado é menor que *F* tabelado (para o nível de confiança de 95%, e 20 graus de liberdade).

Como pode ser observado na Tabela 1, todos os valores de *F* calculados foram menores que *F* tabelados, indicando assim que as variâncias podem ser consideradas iguais. Quando as variâncias podem ser consideradas iguais no teste *F*, os dados são agrupados como variâncias equivalentes e o teste *t* de *Student* é aplicado. Conforme apresentado na Tabela 1, todos os valores de *t* calculado foram menores que de *t* tabelado (para 40 graus de liberdade). Logo, é possível afirmar que não há efeito matriz nem para as amostras de esgoto de entrada no sistema, nem para as amostras de saída do sistema. Não foi calculado o teste *F* para o BPA nas amostras de entrada, pois apareceu um pico interferente no tempo de retenção do analito, questão que está sendo estudada e resolvida.

Tabela 1: Valores do teste *F* e do teste *t* de *Student* para as amostras de esgoto de entrada no sistema.

Composto	Esgoto Entrada				Esgoto Saída			
	<i>F</i> calculado	<i>F</i> tabelado	<i>t</i> calculado	<i>t</i> tabelado	<i>F</i> calculado	<i>F</i> tabelado	<i>t</i> calculado	<i>t</i> tabelado
BPA	—	—	—	—	1,17	2,12	0,09	1,68
EE2	1,03	2,39	-0,85	1,69	1,06	2,28	-0,49	1,69
LEV	1,13	1,7	0,07	1,68	1,13	1,70	0,07	1,68

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) operacional (do cromatógrafo) foram obtidos a partir da injeção de soluções dos analitos de interesse, diluídas sucessivamente, em fase móvel, observando qual a menor concentração deles seria identificada pelo equipamento, com precisão e exatidão aceitáveis. O valor de concentração que correspondeu a um coeficiente de variação (CV) menor que 20% foi considerado o limite de quantificação e o menor ponto identificado com CV maior que 20% e com relação de área de sinal/ruído igual a 3 foi considerado o limite de detecção. Assim, os valores de LOD do aparelho foram 0,007 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para LEV, 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para BPA, e 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para EE2. Os LOQs foram 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para LEV, 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para BPA, e 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para EE2.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram obtidos da mesma maneira, porém levando-se em consideração o fator de concentração de 50 vezes. Desse modo os valores encontrados para LD do método foram 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para LEV, 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para BPA, e 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para EE2, e para LQ foram 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para LEV, 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para BPA, e 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para EE2.

Bernadelli (2014) obteve para etinilestradiol LOD de 7,7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LOQ de 25,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e LQ de 0,61 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (praticamente igual ao encontrado neste estudo), em HPLC-DAD. Campos (2014) obteve LOQ de 2,52 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e LOD de 1,26 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para EE2, utilizando HPLC-DAD, limites maiores que os encontrados neste experimento. Fernandes et al. (2011) obtiveram LQ de 0,0679 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para EE2 em HPLC-DAD em amostras de água tratada, talvez por isso tenha conseguido encontrar limites menores do que os autores conseguem em amostras de águas residuárias. Montagner e Jardim (2011) obtiveram LOD de 0,019 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e LOQ de 0,063 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para levonorgestrel em HPLC-DAD. Torres (2009) considerou o LOD de 0,09 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como LD, e o LOQ de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como LQ para EE2 em HPLC-DAD.

A avaliação da linearidade e a faixa linear de trabalho foram realizadas pela equação da regressão linear dos compostos, e também observou-se a distribuição dos resíduos por meio do teste estatístico ANOVA, de acordo com INMETRO (2007). Para o levonorgestrel a curva possuía nove pontos, variando de 0,025 a 30,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para BPA e EE2 as curvas eram compostas de 8 pontos, variando de 0,025 a 15,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada ponto das curvas analíticas foram injetados três vezes.

A linearidade e faixa linear de trabalho estão apresentadas na Figura 3, onde é possível observar que para LEV, e para BPA e EE2 houve linearidade, com coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,999 para os três compostos, e a distribuição dos resíduos foi aleatória.

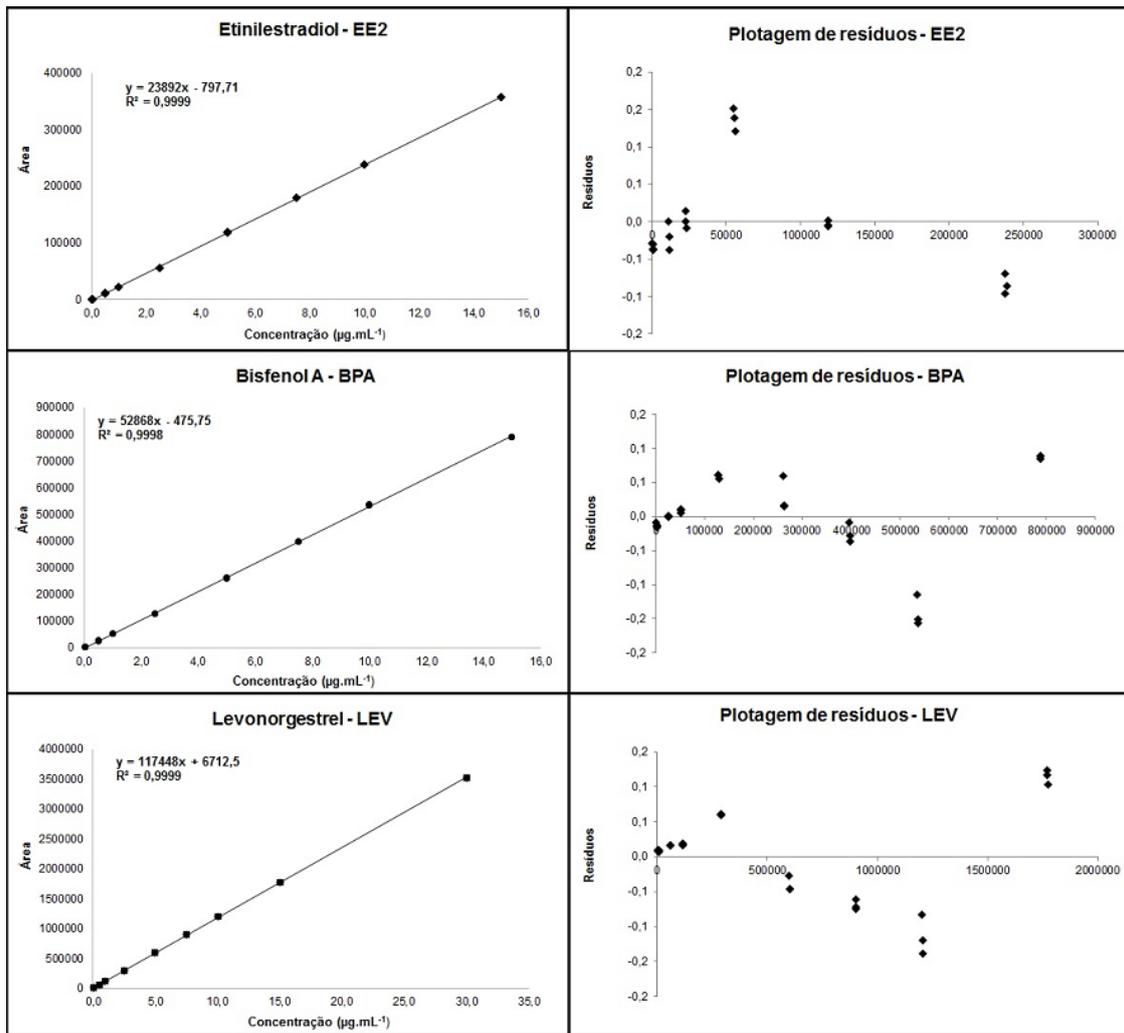


Figura 3: Linearidade, faixa linear e distribuição dos resíduos.

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, que foram realizados adicionando-se concentrações conhecidas dos analitos em amostras isentas dos mesmos em três diferentes níveis de concentração – baixa, média e alta. A precisão foi obtida através da determinação do coeficiente de variação das replicatas no mesmo dia (repetitividade) e em dias diferentes (precisão intermediária). Para BPA e EE2 o nível baixo foi 10 µg.L⁻¹, o médio 50 µg.L⁻¹ e o alto 100 µg.L⁻¹. Já para LEV o nível baixo foi também 10 µg.L⁻¹, o médio 100 µg.L⁻¹, e o alto 1000 µg.L⁻¹, faixa de concentração foi maior devido ao fato deste composto estar em maior quantidade na pílula anticoncepcional utilizada no experimento. Após a adição dos analitos, as amostras foram processadas seguindo a metodologia de análise (filtração prévia, extração em fase sólida, etc.) e injetadas no cromatógrafo.

Na Tabela 2 é possível observar os valores de recuperação dos três compostos nos níveis baixo, médio e alto com três replicatas para cada concentração. Os valores de recuperação permaneceram entre 70 e 120% e portanto a exatidão do método ficou dentro dos níveis aceitáveis (SANCO, 2009). Como todas as amostras foram processadas e injetadas no mesmo dia (27/07/2016) esses valores foram considerados como repetitividade, sendo que os valores de coeficientes de variação das amostras ficaram abaixo de 20%, indicando que o método possui precisão adequada (SANCO, 2009).

Tabela 2: Recuperações obtidas para os compostos em três níveis de concentração e repetitividade do método analítico.

Analito	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%) (n=3)	CV (%)*
Ethinilestradiol	10	97,7	0,8
	50	98,2	0,5
	100	105,8	2,2
Bisfenol A	10	96,5	5,5
	50	95,3	0,6
	100	98,4	2,3
Levonorgestrel	10	83,0	4,6
	100	96,9	1,1
	1000	91,4	6,8

*CV = coeficiente de variação, indicando repetitividade do método analítico.

Os valores de precisão intermediária foram obtidos ao longo do tempo, junto com as análises das amostras oriundas dos experimentos e os valores de recuperação e de coeficientes de variação sempre ficaram dentro das faixas aceitáveis. A robustez foi avaliada através de pequenas variações, como por exemplo, de fase móvel e temperatura da sala de preparo de amostras. Como os coeficientes de variação dos resultados obtidos da injeção das amostras fortificadas em diferentes dias, com diferentes temperaturas e diferentes marcas dos solventes utilizados foram todas menores que 20%, é possível concluir que o método é robusto e preciso.

Foram estudadas por Ávila et al. (2014b) e Martín (2013), quatro *wetlands* construídas de fluxo vertical com superfície de 6,2 m² cada para tratamento de EE2 e outros interferentes endócrinos em esgoto municipal. Dois sistemas utilizavam brita como meio suporte, e outros dois areia. A coleta foi feita por amostras compostas diárias, porém os autores não identificaram EE2 nas amostras nem de entrada e nem de saída por estar abaixo do limite de detecção operacional (LOD) de 90 ng.L⁻¹. Por este motivo, no presente trabalho adicionou-se concentrações maiores dos analitos para que pudessem ser detectados pelo método desenvolvido e, desse modo, avaliar a remoção dos mesmos nas *wetlands* estudadas.

Na Figura 4 estão apresentadas as concentrações médias de entrada e saída de BPA, EE2 e LEV na fase de baixa concentração (a) e na fase de alta concentração (b). Observa-se que apesar de ser adicionada ao esgoto uma quantidade fixa dos compostos, devido ao bombeamento e da vazão de entrada no momento da análise esta concentração se altera um pouco. Os valores de remoção de BPA variaram de 33,6 a 85,9%, para EE2 as remoções variaram de 35,5 a 67,9%, e as remoções para LEV variaram de 92,8 a 100,0%.

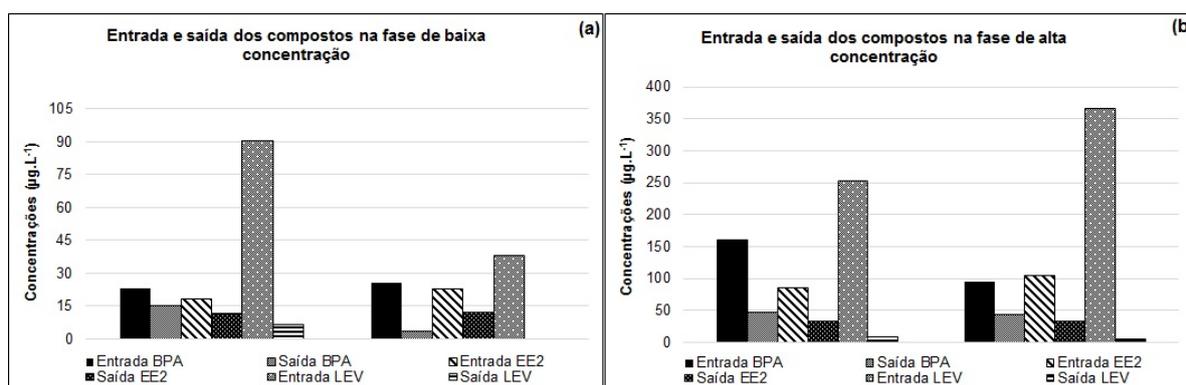


Figura 4: Concentrações de entrada e saída de BPA, EE2 e LEV nas fases de concentração baixa e alta do experimento em dois experimentos diferentes.

Toro-Vélez et al. (2016) utilizaram *wetlands* de fluxo subsuperficial horizontal em escala piloto, como a deste estudo, e observaram para BPA remoção de 73,3 ($\pm 19\%$) na *wetland* cultivada com *Heliconia psitacorum*, 70,2 ($\pm 27\%$) na *wetland* cultivada com *Phragmites australis*, e 62,2 ($\pm 33\%$) na *wetland* sem planta.

Papaevangelou et al. (2016) também estudaram remoção de BPA em *wetlands* de fluxo subsuperficial horizontal em escala piloto, e obtiveram remoções médias de 49,6% nas cultivadas com *Phragmites australis*, 50% nas *wetlands* cultivadas com *Typha latifolia*, e 55,4% em *wetlands* sem planta.

Ávila et al. (2014a) pesquisaram a retenção de EE2 adicionado à esgoto municipal por um sistema híbrido de *wetlands* contendo duas de fluxo vertical, uma de fluxo horizontal e uma de fluxo superficial, cultivadas com *Phragmites australis* em escala piloto. Os autores estudaram 3 diferentes taxas de carregamento hidráulico (TCH), realizando injeção contínua de EE2 e outros interferentes endócrinos. Os autores observaram que quanto maior o TCH menores foram as taxas de retenção, que ficaram entre 20 e 80% para EE2, e de 11 a 90% para BPA, variações próximas ao do presente estudo.

Kumar et al. (2011) estudou a atenuação natural do hormônio etinilestradiol em três diferentes tanques, um com macrófitas flutuantes (Tanque 1), um com macrófitas emergentes e submersas integradas (Tanque 2) e um sistema com macrófitas submersas enraizadas juntamente com microalgas (Tanque 3). Segundo o autor, o Tanque 1 se mostrou mais eficiente na remoção de EE2 (EE2 – 69,1%), valor próximo ao máximo encontrado no presente estudo; já o Tanque 2 obteve 18,5% de remoção, e o Tanque 3 7,7% para EE2.

A eficiência de três *wetlands* cultivadas com *Phragmites australis* com três profundidades diferentes, de fluxo vertical e areia como meio suporte para polimento de um efluente municipal após tratamento convencional e terciário visando remoção de etinilestradiol foi avaliada por Song et al. (2009), que relatou que a melhor remoção do hormônio ocorreu na *wetland* extremamente superficial (denominada pelos autores como ES), que possuía 7,5 cm de profundidade e TDH de 3,1 horas. Os autores relatam que a operação da *wetland* ES em condições não saturadas, alta densidade de raízes das macrófitas e manutenção das condições aeróbias na *wetland* foram as principais condições para uma boa remoção de estrogênios – tendo em vista que apenas 12% da remoção de estrogênios foi devida à adsorção dos mesmos na areia da *wetland*.

CONCLUSÕES

O método analítico mostrou ser eficiente, sensível e adequado para a quantificação dos analitos em amostras de esgoto sintético provenientes de *wetland construída*. Além disso, o sistema de tratamento por *wetland* cultivada com *Cyperus isocladius* foi eficiente para a remoção, em maiores ou menores quantidades, dos três interferentes endócrinos estudados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida (Processo n.º 149364/2014-8), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado concedida, ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAPEX-UNICAMP), à comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia Agrícola (UNICAMP) e à Embrapa Meio Ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÁVILA, C.; MATAMOROS, V.; REYES-CONTRERAS, C.; PIÑA, B.; CASADO, M.; MITA, L.; RIVETTI, C.; BARATA, C.; GARCÍA, J.; BAYONA, J. M. Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater. *Science of the Total Environment*. v. 470 – 471, p. 1272 – 1280, 2014a.
2. ÁVILA, C.; NIVALA, J.; OLSSON, L.; KASSA, K.; HEADLEY, T.; MUELLER, R. A.; BAYONA, J. M.; GARCÍA, J. Emerging organic contaminants in vertical subsurface flow constructed wetlands: Influence of media size, loading frequency and use of active aeration. *Science of the Total Environment*. v. 494 – 495, p. 211 – 217, 2014b.
3. BERNADELLI, J. K. B. *Biodegradação de estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em sistemas aeróbios de tratamento*. 197p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2014.

4. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE n.º 899, de 29 de maio de 2013*. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União. Poder Executivo, junho de 2003.
5. CAMPOS, J. M. *Eficiência de sistemas de leitos cultivados com Eichhornia crassipes na retenção de poluentes convencionais e o emergente 17- α -etinilestradiol*. 257p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2014.
6. FERNANDES, R.; JUNIOR, R. B. 17- α -Ethinylestradiol Removal from Supplying Water, using different Physicist-chemistry Treatment Technologies. *Revista DAE*. p. 20 – 27, Campinas, setembro, 2011.
7. 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, p. 463 – 471, 2011.
8. HIJOSA-VALSERO, M.; MATAMOROS, V.; SIDRACH-CARDONA, R.; MARTÍN-VILLACORTA, J.; BÉCARES, E.; BAYONA, J. M. Comprehensive assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. *Water Research*. v. 44, p. 3669 – 3678, abr., 2010.
9. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008. Revisão 2 – junho, 2007.
10. IOMC - INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS. *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012: Summary for Decision-Makers*. United Nations Environment Programme and the World Health Organization. Switzerland, 2012.
11. KOOKANA, R.; WILLIAMS, M.; WALLER, N. *Endocrine-disrupting chemicals in the Australian environment: Background and current research in Australia*. Land & Water Australia, Canberra, 2007.
12. KUMAR, A. K.; CHIRANJEEVI, P.; MOHANAKRISHNA, G.; MOHAN, S. V. Natural attenuation of endocrine-disrupting estrogens in an ecologically engineered treatment system (EETS) designed with floating, submerged and emergent macrophytes. *Ecological Engineering*. v. 37, p. 1555 – 1562, jul. 2011.
13. MARTÍN, C. A. *Effect of design and operational factors on the removal efficiency of emerging organic contaminants in constructed wetlands for wastewater treatment*. 262f. Thesis (PhD in Environmental Engineering) – Institute of Environmental Assessment and Water Research, Universitat Politècnica de Catalunya – Barcelona Tech. Barcelona, 2013.
14. MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Journal Brazilian Chemistry Society*. v. 22, n.8, p. 1452 – 1462, 2011.
15. PAPAÉVANGELOU, V. A.; GIKAS, G. D.; TSIHRINTZIS, V. A.; ANTONOPOULOU, M.; KONSTANTINOOU, I. K. Removal of Endocrine Disrupting Chemicals in HSF and VF pilot-scale constructed wetlands. *Chemical Engineering Journal*. v. 294, p. 146 – 156, fev. 2016.
16. RAIMUNDO, C. C. M. *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, Campinas. 2007.
17. SANCO/10684/2009. METHOD VALIDATION AND QUALITY CONTROL PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED. Implemented by 01/01/2010.
18. SANTOS, I. J. S.; GROSSMAN, M. J.; SARTORATTO, A.; PONEZI, A. N.; DURRANT, L. R. Degradation of the recalcitrant pharmaceuticals carbamazepina and 17- α -ethinylestradiol by lignolytic fungi. *Chemical Engineering Transactions*. v. 27, p. 169 – 174, 2012.
19. SONG, H. L.; NAKANO, K.; TANIGUCHI, T.; NOMURA, M.; NISHIMURA, O.. Estrogen removal from treated municipal effluent in small-scale constructed wetland with different depth. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 2945 – 2951, fev., 2009.
20. TORO-VÉLEZ, A. F.; MADERA-PARRA, C. A.; PEÑA-VARÓN, M. R.; LEE, W. Y.; BEZARES-CRUZ, J. C.; WALKER, W. S.; CÁRDENAS-HENAO, H.; QUESADA-CALDERÓN, S.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, H.; LENS, P. N. L. BPA and NP removal from municipal wastewater by tropical horizontal subsurface constructed wetlands. *Science of the Total Environment*. v. 542, p. 93 – 101, 2016.
21. TORRES, N. H. *Monitoramento de resíduos dos hormônios 12 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP*. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2009.
22. USEPA. *Method 539: Determination of hormones in drinking water by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*. EPA Document n.º 815-B-10-001, Cincinnati, Ohio/USA, nov., 2010. 36 p.