

I-337 - REMOÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTRADIOL, ESTRONA E ETINILESTRADIOL POR MEIO DE NANOFILTRAÇÃO – AVALIAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA

Marcelo Rodrigues Barreto⁽¹⁾

Estudante de Engenharia Ambiental da Universidade de Brasília (UnB). Bolsista de iniciação científica do Programa ProIC/UnB.

Arthur Tavares Schleicher⁽¹⁾

Engenheiro Civil pela Universidade de Brasília (UnB). Mestrando do Programa de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos da UnB.

Dênio Souza Costa⁽²⁾

Químico. Mestre em Química Orgânica pela Universidade de Brasília (UnB).

Cristina Celia Silveira Brandão⁽¹⁾

Doutora em Engenharia Ambiental pelo Imperial College of Science and Technology da Universidade de Londres. Professora do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UnB

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília. Campus Universitário Darcy Ribeiro. Brasília – DF. CEP: 70.910-900. Endereços eletrônicos: marcelorbarreto@hotmail.com, arthur.schleicher@yahoo.com.br, cbrandao@unb.br.

RESUMO

Tendo em vista as crescentes evidências sobre os riscos associados ao consumo de águas contaminadas por hormônios estrógenos, esse trabalho buscou avaliar a eficiência de remoção por nanofiltração de três compostos, Estrona (E1), 17 β -Estradiol (E2) e 17 α -Etinilestradiol (EE2). Para o desenvolvimento do trabalho utilizou-se uma instalação de nanofiltração em escala de bancada com fluxo tangencial. A remoção dos compostos foi avaliada considerando duas matrizes distintas, água ultrapura e água do lago Paranoá (Brasília-DF). Optou-se pela Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de massa como método analítico para a detecção e quantificação dos hormônios. A nanofiltração foi capaz de remover grande parte dos contaminantes apresentando remoções superiores a 80% durante as 10 horas de ensaio sem apresentar sinais de fouling ou de processos adsorptivos.

PALAVRAS-CHAVE: Nanofiltração, Micropoluentes, Perturbadores Endócrinos, Separação por Membranas, Hormônios Estrógenos.

INTRODUÇÃO

A conscientização sobre os riscos associados ao consumo de águas contaminadas tem impulsionado o desenvolvimento de métodos avançados de análise, e com isso, permitido a cientistas conhecer cada vez mais informações relativas a compostos presentes em pequenas concentrações na água, geralmente referenciados como micropoluentes (ZAFRA-GOMEZ *et al.*, 2008; RODIL *et al.*, 2009; GROS *et al.*, 2009; PAILLER *et al.*, 2009; TRENHOLM *et al.*, 2009).

Os chamados micropoluentes são compostos de natureza diversa, podendo ser orgânicos e inorgânicos. Entre os micropoluentes orgânicos se destacam os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, pesticidas, produtos industriais, hormônios animais e de plantas e outros compostos (SODRÉ *et al.*, 2010). Algumas dessas substâncias, mesmo em concentrações muito baixas (ng.L⁻¹), tem causado distúrbios endócrinos em animais (COLBORN *et al.*, 1993; ROUTLEDGE *et al.*, 1998; LEGLER *et al.*, 2002; CANESI *et al.*, 2007) e humanos (BRENDHULT *et al.*, 2007; HANNET *et al.*, 2008; GIWERCMAN *et al.*, 2007). Esses compostos têm sido denominados perturbadores endócrinos (PE).

Um grupo de grande importância dentre os PE são os hormônios estrógenos, talvez por ser o grupo que tem um maior potencial de apresentar riscos ao ambiente e à saúde. Os principais hormônios estrógenos produzidos por seres humanos são 17 β -Estradiol (E2) e Estrona (E1). Além desses produzidos naturalmente, tem-se, também, o 17 α -Etinilestradiol (EE2) que é um hormônio sintético utilizado em larga escala em tratamentos contraceptivos.

Esses compostos chegam aos corpos hídricos principalmente pelas descargas de efluentes domésticos, tratados ou não. A remoção por métodos tradicionais como lodo ativado pode atingir eficiências altas. Ternes *et al.* (1999) reportam remoções de até 99,9% para o E2 e 83% para E1 na estação de tratamento de esgotos (ETE) da Penha no Rio de Janeiro. Porém muitas questões são levantadas sobre o destino desses compostos nessa degradação.

Os processos de separação por membrana (PSM) vêm se popularizando em vários países e podem substituir com algumas vantagens os processos convencionais de tratamento, como por exemplo: redução do consumo de energia; diminuição do emprego de produtos químicos; melhora da qualidade da água. Outra vantagem é a maior facilidade na operação e dimensionamento de estações por serem unidades modulares. No Brasil a utilização de processos de separação por membranas no campo do tratamento de água para consumo humano e de esgotos domésticos, provavelmente em função da dependência tecnológica, visto que não se produz, em larga escala, membranas no país.

Na literatura internacional existe um número razoável de publicações sobre a remoção de hormônios por membranas, particularmente de nanofiltração (MCCALLUM *et al.*, 2008; BODZEK e DUDZIAK, 2006^b; NGHIEM *et al.*, 2004, entre outros). As eficiências de remoção relatadas para os hormônios estrógenos (E1, E2 e EE2) são variáveis e dependem muito do tipo de membrana utilizada em cada experimento. Membranas com peso de molecular de corte menores (<300 Da) mostraram eficiências de remoção superiores (>70%) para os três hormônios. Esses estudos indicam como os principais mecanismos de separação a exclusão por tamanho e a adsorção na membrana. Os resultados também apontam para uma retenção superior em matrizes que continham matéria orgânica na sua composição, fato ligado à associação dessa aos compostos, geralmente de pequenas dimensões.

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar, em caráter preliminar, a remoção de três hormônios estrógenos por meio de separação em membranas. Foram realizados ensaios de nanofiltração em escala de bancada, avaliando a eficiência e fatores que influenciem a separação de E1, E2 e EE2 em duas matrizes distintas (água milli-Q e água do lago Paranoá).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizada uma instalação de bancada de fluxo tangencial. A escolha desse tipo de unidade foi motivada pelo fato de que o fluxo tangencial diminui a tendência a concentração por polarização promovendo uma maior rejeição. Essa escolha segue a tendência observada em outros trabalhos que também optaram pelo fluxo tangencial (NGHIEM *et al.*, 2004; BODZEK e DUDZIAK, 2006^b; AMORIM, 2007, SCHÄFER e SEMIÃO, 2011). A Figura 1 apresenta o esquema de montagem da instalação experimental.

A Figura 1 e a Tabela 1 detalham o esquema de montagem e as características da montagem do equipamento.

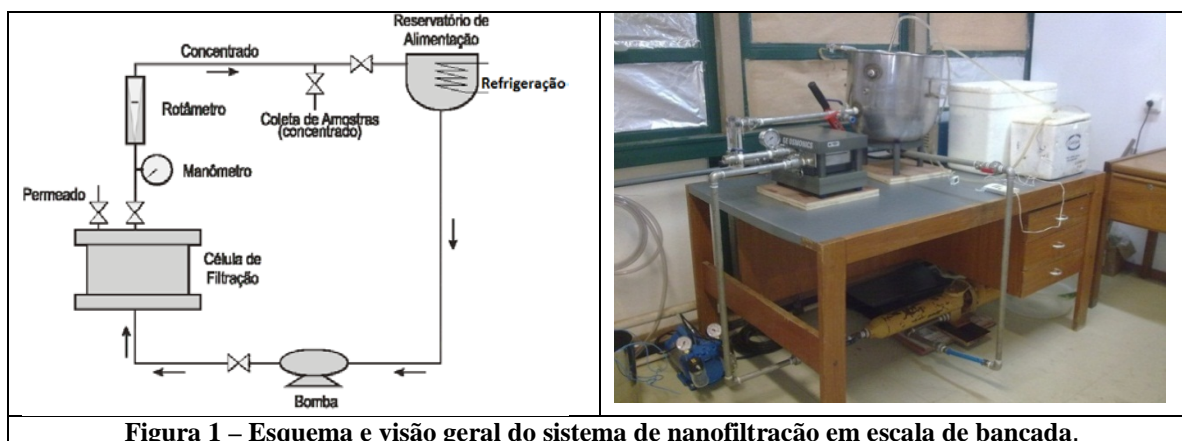


Figura 1 – Esquema e visão geral do sistema de nanofiltração em escala de bancada.

Tabela 1 - Característica dos componentes da instalação de nanofiltração em escala de bancada

Elemento	Principais características
Bomba	Tipo centrífuga multiestágio, potência de 0,5 cv, 80 m.c.a. de pressão para vazão de 0,6 m³/h.
Célula de filtração	Confecção em aço inox, pressão máxima de trabalho de 6900 KPa, dotada de manômetro com precisão de 2 bar, bomba manual de pressão máxima de 70 bar.
Sistema de Refrigeração	Refrigeração por circulação de água gelada por uma serpentina em aço inox com 12 m de comprimento
Manômetro	Pressão máxima aferível de 100 bar, precisão de 2 bar
Reservatório de alimentação	Confecção em aço inox, volume nominal de 20L
Rotâmetro	Confecção em acrílico, fluxo máximo de 5 gpm, precisão de 0,2 gpm
Tubulação e acessórios	Confecção em aço inox, diâmetro de 1"

A célula de separação utilizada é da marca Osmonics, modelo Sepa II-Cross-Flow. Assim como os outros componentes do sistema ela é totalmente confeccionada em aço inox, com exceção do espaçador, carreador do permeado e membranas.

Foi utilizada no experimento a membrana composta por uma camada de poliamida sobre suporte de polissulfona Desal DK. Essa membrana possui, segundo informado pelo fabricante, um peso molecular de corte entre 150 e 300 Daltons, uma tolerância para variação de pH de 2 a 11 e uma rejeição de sal de 98% (MgSO₄). O potencial Zeta dessa membrana no pH de trabalho ($\approx 6,5$) é de -16 mV de acordo Nghiem *et al.* (2010) e o ângulo de contato é de 58,3° de acordo com Norberg *et al.*, (2007). A área efetiva de separação da membrana era de 140 cm²

Foram utilizadas 2 matrizes distintas para a realização do ensaio, água Milli-Q e água do lago Paranoá. A água do lago foi coletada no braço norte, nas proximidades da estação de tratamento de esgotos ETEB norte, conforme mostrado na Figura 2.



Figura 2 - Ponto de coleta de água do lago Paranoá

A água do lago Paranoá foi coletada no dia anterior ao do experimento e passou por um processo de pré-tratamento para que suas características ficassem compatíveis com o tratamento por nanofiltração. O pré-tratamento consistiu na filtração a vácuo das amostras em membranas de poro com 0,45 µm de diâmetro, utilizando um sistema de filtração de bancada. Esse pré-tratamento equivale ao observado em estações de tratamento, onde a nanofiltração é normalmente precedida de um processo de microfiltração (SIDDIQUI *et al.*, 2000).

Cada experimento de nanofiltração contemplava dois ensaios que obedeceram a sequência de etapas apresentada na Figura 3, que são detalhadas nos itens que se seguem.

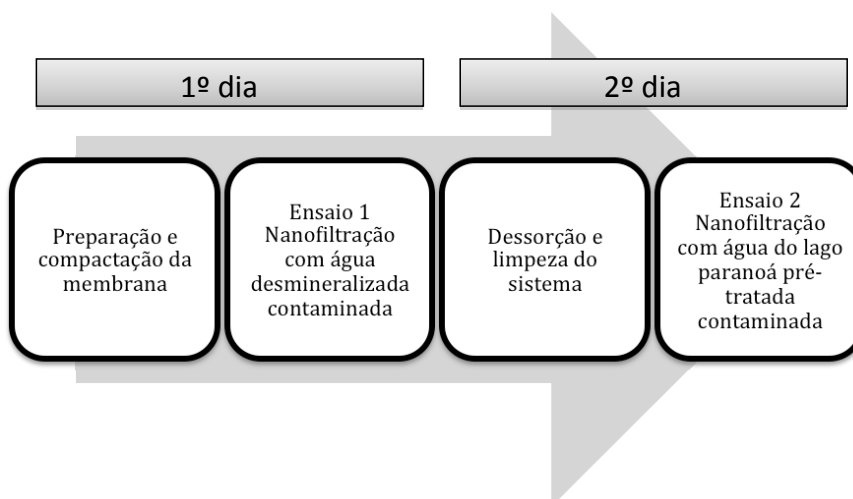


Figura 3 - Dinâmica dos experimentos de nanofiltração

A membrana era deixada em água Milli-Q durante 24h e depois era iniciado o processo de compactação que consistia em fazer circular no sistema 20L de água Milli-Q com um fluxo de $1,8 \text{ L.min}^{-1}$ e temperatura controlada entre 20 e 22°C . Esse procedimento visou ao condicionamento da membrana às pressões de trabalho para que ao início do ensaio a vazão de permeado seja constante e isso não influencie nos valores de rejeição. Testes preliminares determinaram que uma compactação durante 30 minutos a pressão de 1000 kPa eram suficientes para se obter um fluxo constante.

Após a compactação o sistema passava a ser alimentado com uma solução contendo cerca de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada hormônio (E1, E2 e EE2). Optou-se por essa concentração por ser compatível com os limites de detecção obtidos nos métodos analíticos, dispensando assim a utilização de métodos de extração para detecção dos compostos, minimizando os erros analíticos.

A pressão de trabalho escolhida foi de 820 kPa com um fluxo de 4 L.min^{-1} o que equivale a uma velocidade tangencial de $0,42 \text{ m.s}^{-1}$. A temperatura também foi controlada entre 20 e 22°C durante todo o ensaio.

Em um experimento, cada ensaio tinha a duração de 10 horas. Amostragem foi feita a cada meia hora durante as duas primeiras horas e a cada hora subsequentemente. As amostras foram refrigeradas para análise no dia seguinte.

No decorrer do ensaio também eram realizadas medidas volumétricas da vazão do permeado com uma proveta. Após essa medida o permeado era colocado novamente no reservatório de alimentação. Optou-se pela recirculação tanto do permeado como do concentrado para manter constante a concentração do reservatório de alimentação, aproximando-se assim do que ocorre em uma estação de tratamento normalmente.

A fim de realizar uma limpeza do sistema e eliminar a influência de possíveis efeitos adsorptivos na eficiência da membrana durante o ensaio 2 (matriz água do lago Paranoá) eram colocados 20 L de água Milli-Q no reservatório de alimentação e realizava-se uma circulação durante 1 hora. No final dessa hora a água era drenada e o procedimento era repetido mais uma vez.

O ensaio 2 seguiu os mesmos procedimentos do ensaio 1. A diferença era na matriz do ensaio no qual foi utilizada água do lago Paranoá ao invés de água Milli-Q. Foi escolhida uma matriz complexa para avaliar possíveis efeitos causados pela matéria orgânica ou outros compostos dissolvidos que podem influenciar a nanofiltração. Nesse ensaio eram realizadas medidas de turbidez, condutividade, alcalinidade e pH tanto para a amostra bruta do lago como para a amostra pré-tratada para melhor caracterizar a matriz.

A detecção e quantificação dos hormônios foi realizada em um sistema LC-MS/MS composto de uma bomba quaternária Agilent 1200 acoplada a um espectrômetro de massas 3200 QTRAP com triplo-quadrupolo (Applied Biosystems/MDS SCIEX Instruments), operando com ESI em modo positivo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa Eclipse XDB-C18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, tamanho de partícula de $5 \mu\text{m}$, Agilent Technologies) a 22°C com gradiente de eluição. Os eluentes utilizados foram

água Milli-Q e metanol com um fluxo de 0,6 ml/min. O tempo total de corrida cromatográfica utilizada foi de 14 minutos. Os padrões analíticos Estrona (E1), 17 β estradiol (E2) e 17 α -Ethinilestradiol (EE2) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados seis (6) experimentos de nanofiltração de acordo com a dinâmica mostrada na Figura 4. A Figura 4 apresenta resultados representativos dos ensaios cuja a matriz utilizada era a água Milli-Q (Ensaio 1).

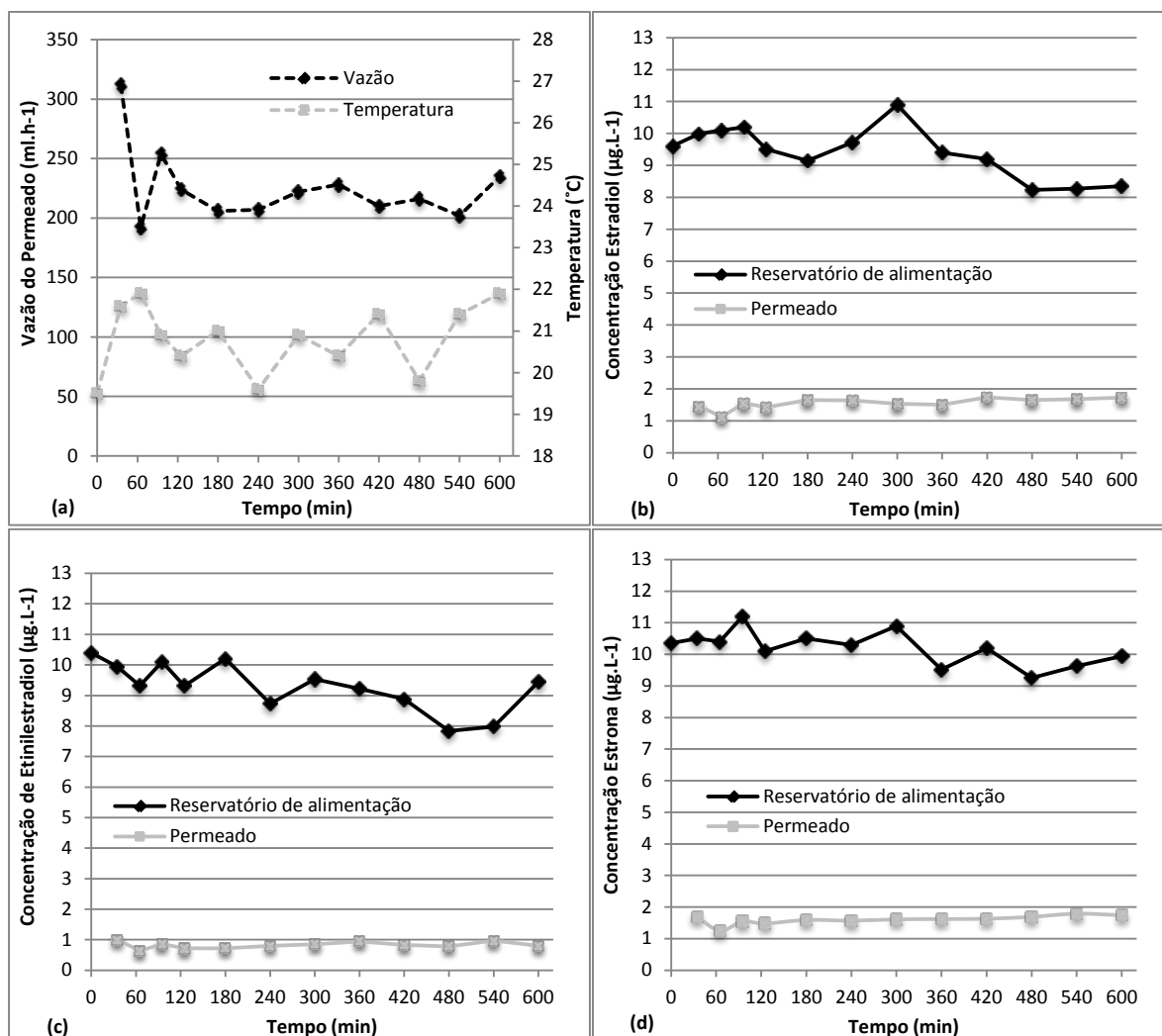


Figura 4 - Resultados representativos dos ensaios de nanofiltração com água Milli-Q. Temperatura e vazão do permeado (a), concentração do permeado e do reservatório de alimentação para estradiol (E2) (b), etinilestradiol (EE2) (c) e estrona (E1) (d).

A vazão de alimentação variou entre 0,20 e 0,25 L.h⁻¹ durante todo período do ensaio (Figura 4a). Levando em consideração a área efetiva de separação da membrana (140 cm²) isso equivale a um fluxo médio de cerca de 16 L.h⁻¹m⁻², valor que condiz com outros adotados em trabalhos publicados (AMORIM, 2007; SHÄFER e SEMIÃO, 2011). No início da operação observou-se alguma variação desse valor que foi atribuído a um possível erro experimental, porém é um fator a ser analisado em futuros experimentos.

O controle de temperatura ocorreu como esperado, com valores variando entre 19,8 e 22°C (Figura 4a). A temperatura é um importante parâmetro de controle pois pode afetar as características estruturais da membrana além de, em caso de aquecimento, gerar degradação dos compostos, ocasionando uma superestimação dos valores de remoção.

As concentrações iniciais no reservatório de alimentação ficaram próximas de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ para todos os 3 compostos. Durante o ensaio observou-se oscilações na concentração dos compostos, porém não foi possível observar nenhuma tendência específica para etinilestradiol e estrona. Para estradiol (Figura 4b) se observa uma tendência de diminuição da concentração durante o ensaio sugerindo a ocorrência de processo adsorptivo ou pequena degradação do composto. Resultados obtidos em ensaios preliminares não confirmaram essa tendência logo supõe-se que esse decaimento tenha ocorrido devido a um erro experimental, provavelmente por diferenças de concentração no reservatório de alimentação

A concentração do estradiol e da estrona no permeado apresentou valores entre 1 e $2 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para etinilestradiol os valores foram menores, ficando ligeiramente abaixo $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ durante todo ensaio. As eficiências de remoção resultantes foram, portanto, superiores a 80% durante a duração do ensaio. Esses valores de eficiência estão de acordo com outros trabalhos publicados (MCCALLUM *et al.*, 2008; BODZEK e DUDZIAK, 2006^b; NGHIEM *et al.*, 2004; COMERTON *et al.*, 2008 e AMORIM, 2007) que utilizaram membranas com peso de corte inferior a 300 Da. Porém é importante ressaltar que os dados obtidos possuem certo grau de incerteza por terem ficado abaixo do LQ do método analítico.

Resultados representativos do Ensaio 2, utilizando água do lago Paranoá como matriz (características resumidas na Tabela 2), são apresentados na Figura 5.

Tabela 1 - Características da amostra do Lago Paranoá.

Parâmetro	Bruta	Pré-Filtrada*
Turbidez (UT)	6,0	0,26
Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	87	91
pH	6,4	6,3
Alcalinidade	16 $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$	

* Filtração em membrana de $0,45 \mu\text{g/L}$

O sistema de controle de temperatura foi novamente efetivo, e a temperatura variou entre 21 e 23°C (Figura 5a). A temperatura inicial ligeiramente superior ($24,1^\circ\text{C}$) foi em virtude da matriz se encontrar na temperatura ambiente antes do início do ensaio.

A vazão novamente manteve-se estável com valores entre 0,2 a $0,25 \text{L.h}^{-1}$. Esses valores coincidem com os valores obtidos para o ensaio com a água Milli-Q ($16 \text{L.h}^{-1}.\text{m}^2$). Esses dados indicam que a matriz utilizada não gerou problemas perceptíveis de fouling na membrana. O pré-tratamento (filtração em membrana de microfiltração) provavelmente teve uma influência positiva nesse aspecto.

A concentração inicial no reservatório de alimentação foi de $11 \mu\text{g.L}^{-1}$ para estradiol, $13 \mu\text{g.L}^{-1}$ para estrona e $11,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para etinilestradiol. A concentração dos três compostos no tanque de alimentação se comportou de maneira semelhante, com uma diminuição de concentração durante as 3 primeiras horas do ensaio. A diferença entre a concentração inicial e a concentração no período mais estável é de cerca de $3 \mu\text{g.L}^{-1}$. A hipótese que se levanta para explicar esse comportamento é que as substâncias dissolvidas na matriz, principalmente a matéria orgânica, tenham uma maior tendência à adsorção em superfícies e, ao mesmo tempo, tenham grande afinidade com os hormônios estudados. Dessa forma, essas substâncias orgânicas são adsorvidas em diferentes partes do sistema, e com elas, também são adsorvidos os hormônios. À medida que os sítios de adsorção eram ocupados e a concentração do circulado diminuía, também diminuía a tendência a adsorção, e o sistema entrava em um equilíbrio.

A concentração de hormônios no permeado apresentou valores ligeiramente maiores do que no Ensaio 1, com água Milli-Q como matriz. A concentração de estradiol e estrona tiveram um aumento durante o ensaio, com valores iniciais em torno de $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e atingindo $2,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ na décima hora. Para o etinilestradiol a concentração manteve-se em cerca de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ durante todo ensaio.

De qualquer maneira se pode observar uma eficiência de remoção alta para todos os 3 compostos. Foram obtidos valores de remoção superiores a 70% para estrona e estradiol durante todo ensaio. Com relação ao etinilestradiol a eficiência de remoção foi ainda mais elevada, com valores superior a 85% durante todo ensaio. Esses resultados novamente ficaram abaixo dos LQ do método, logo é importante cautela na interpretação dos resultados, visto o grau de incerteza presente nessas medidas.

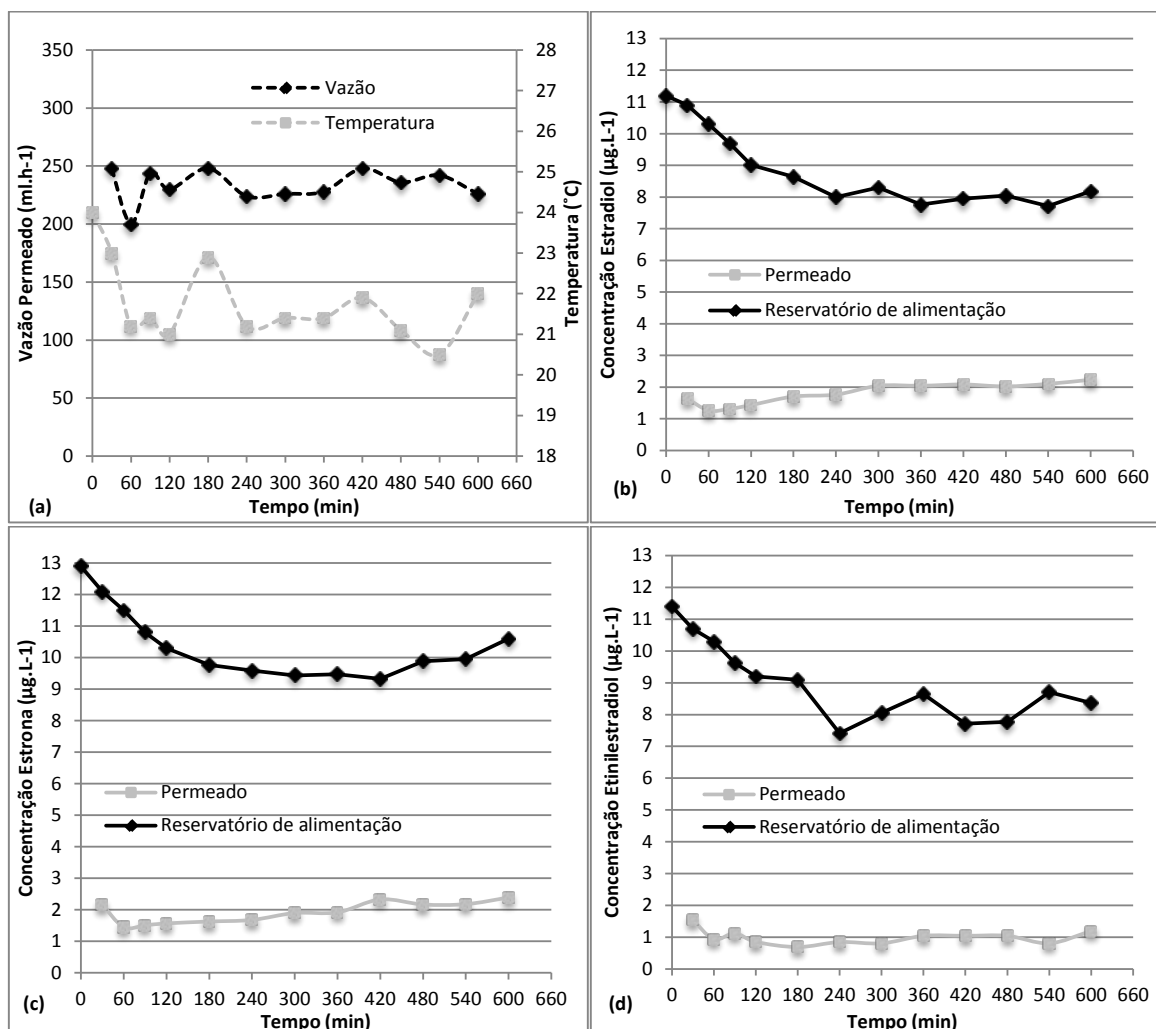


Figura 5 - Resultados representativos dos ensaios de nanofiltração com água do lago Paranoá pré-tratada. Temperatura e vazão do permeado (a), concentração do permeado e do reservatório de alimentação para estradiol (E2) (b), etinilestradiol (EE2) (c) e estrona (E1) (d).

A comparação direta dos valores de eficiência de remoção obtidos com as duas matrizes sugere uma incoerência com as informações da literatura, onde a presença de matéria orgânica dissolvida na matriz favorece positivamente a remoção dos hormônios (SHÄFER *et al.*, 2010; NGHIEM *et al.*, 2004). Entretanto é importante ressaltar que a menor eficiência de remoção obtida com a matriz água do lago Paranoá, ocorre em função da redução da concentração de hormônios na água de alimentação (fenômeno que merece maior investigação) e não em função da concentração de hormônios no permeado serem significativamente maiores no Ensaio 2 do que no Ensaio 1, pois em ambos ensaios as concentrações encontravam-se abaixo do limite de quantificação do método analítico.

CONCLUSÕES

A análise do estado da arte em perturbadores endócrinos aponta para uma grande preocupação sobre os efeitos desses compostos em organismos vivos, sobretudo os compostos produzidos em larga escala como os hormônios estrógenos. Esses compostos se mostraram muitas vezes mais potentes que outras substâncias consideradas perturbadoras endócrinas e com uma presença ubíqua em corpos de água nas proximidades de aglomerações urbanas.

O método analítico utilizado para detecção de estradiol, estrona e etinilestradiol mostrou-se adequado, atingindo um alto nível de linearidade ($\approx 0,99$) e precisão (C.V. $< 5\%$). O método ainda apresentou limites de

detecção e quantificação na ordem de poucos microgramas por litro, indicando que com a adoção de métodos de extração apropriados será possível a análises desses compostos em concentrações presentes em ambientes naturais.

Os ensaios de nanofiltração mostraram o potencial dessa tecnologia como método de remoção de micropoluentes. Os altos valores de eficiência de remoção obtidos em combinação com um regime de operação constante torna uma tecnologia atraente para a área de saneamento. Os resultados obtidos, porém, não são conclusivos com relação à influência da matriz água do lago Paranoá no desempenho da nanofiltração, e sugere-se que uma maior atenção seja dada as possíveis influências da matriz tanto sobre os mecanismos de remoção atuantes na nanofiltração como sobre o método analítico implantado.

Dessa forma, apesar dos altos valores de remoção de hormônios observados no presente trabalho é necessário que um maior número de experimentos, com uma duração maior, sejam conduzidos para comprovar essa eficiência e permitir uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de separação por membranas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMORIM, F. F. Remoção dos contaminantes orgânicos β -estradiol e Saxitoxinas (STX, Neo-STX e de-STX) por meio de nanofiltração: Avaliação em escala de bancada. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, 2007.
2. BODZEK, M.; DUDZIAK, M. Removal of natural estrogens and synthetic compounds considered to be endocrine disrupting substances (EDs) by coagulation and nanofiltration. *Polish Journal of Environmental Studies*, v.15 p.35-40, 2006^a.
3. BODZEK, M., DUDZIAK, M. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Dessalination*, v.198, 24-32, 2006^b.
4. BRENDHULT, C.; BÄCKLIN, B.; OLOVSSON, M. Effects of some endocrine disruptors on the proliferation and viability of human endometrial endothelial cells *in vitro*. *Reproductive Toxicology*, v.23 p.550-559, 2007.
5. CANESI, L.; LORUSSO, L. C.; CIACCI, C.; BETTI, M.; ROCCHI, M.; POJANA, G.; MARCOMINI, A. Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies. *Aquatic Toxicology* v.81 p.36-44, 2007.
6. COLBORN, T.; SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Development Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives* v.101 p.378-383, 1993.
7. COMERTON, A.M., ANDREWS, R.C., BAGLEY, D.M. The influence of natural organic matter and cations on the rejection of endocrine disrupting and pharmaceutically active compounds by nanofiltration. *Water Research*, v.43 p.613-622, 2009.
8. GIWERCMAN, Y. L.; GIWERCMAN, A.; RYLANDER, L. Influence of Endocrine Disruptors on Human Male Fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, Disponível em: www.rbmonline.com/Article/3012, Acessado em 15/07/2012, Vol 15 p.633-642, 2007.
9. GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography / quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry*, v.81 p.898-912, 2009.
10. HANNET, N.; LANCON, A.; DELMAS, D.; JANNIN, B.; CHAGNON, M. C.; CHERKAoui-MALKI, M.; LATRUFFE, N.; ARTUR, Y.; HEYDEL, J. M. Effects of endocrine disruptors on genes associated with 17 β -estradiol metabolism and excretion. *Steroids*, v.73 p.1242-1251, 2008.
11. LEGLER, J.; ZEINSTRA, L. M.; SCHUITMAKER, F.; LANSER, P. H.; BOGERD, J.; BROUWER, A.; VETHAACK, A. D.; VOOGT, P. de; MURK, A. J.; VAN DER BURG, B. Comparison of in Vivo and in Vitro Reporter Gene Assays for Short-Term Screening of Estrogenic Activity. *Environmental Science Technology* v.36 p.4410-4415, 2002.
12. MCCALLUM, E.A.; HYUNG, H.; Do, T.A.; HUAN, C.; KIM, J. Adsorption, desorption, and steady-state removal of 17- β estradiol by nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, v.319, p.38-43. 2008
13. NGHIEM, L.D., MANIS, A., SOLDENHOFF, K., SCHÄFER, A.I., Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 242, p.37-45, 2004.
14. NGHIEM, L.D.; COLEMAN, P.J.; ESPENDILLER, C. Mechanisms underlying the effects of membrane fouling on the nanofiltration trace organic contaminants. *Desalination*, v.250 p.682-687, 2010.

15. NORBERG, D., H., S.; TAYLOR, J.; ZHAO, Y. Surface characterization and performance evaluation of commercial fouling resistant low-pressure RO membranes. *Dessalination*, v. 202, 45-52, 2007.
16. PAILLER, J. Y.; KREIN, A.; POSTER, 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 p.4736–4743, 2009.
17. RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* v.1216 p.2958–2969, 2009.
18. ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G. C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J. P. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Response in Trout and Roach. *Environmental Science Technology* v.32 p.1559-1565, 1998.
19. SCHÄFER, A.I.; FANE, A. G.; WAITE, T. D. Nanofiltration: Principles and Applications. Elsevier. 20.3.4 Endocrine disrupting chemicals (EDCs). p.486-489, 2010.
20. SCHÄFER, A.I., SEMIÃO, A.J.C. Estrogenic micropollutant adsorption dynamics onto nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, v.381 p.132-141, 2011.
21. SIDDIQUI, M.; AMY, G.; RYAN, J.; ODEM, W. Membranes for the control of natural organic matter from surface waters. *Water Research*, v.34, p.3355-3370, 2000.
22. 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 p.92-98, 2010.
23. 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. *Science of Total Environment*, v.225 p.81-90, 1999.
24. TRENHOLM, R.C.; VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. On-line solid phase extraction LC–MS/MS analysis of pharmaceutical indicators in water: a green alternative to conventional methods, *Talanta* v.79 p.1425–1432, 2009.
25. ZAFRA-GÓMEZ A.; BALLESTEROS O.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography–mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v.88 p.87–94, 2008.