



## VI-091 – DEGRADAÇÃO DO ESTRÓGENO 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO

**Alexandre Nunes Ponezi<sup>(1)</sup>**

Bacharelado em Ciências Biológicas, UNIARARAS. Mestre em Engenharia de Alimentos FEA/UNICAMP; Doutorado em Engenharia Civil – Departamento de Saneamento e Ambiente FEC/UNICAMP.

**Aline Maria Furquim Caselatto<sup>(1)</sup>**

Graduação em Tecnologia Sanitária CESET/UNICAMP

**Adilson Sartoratto<sup>(1)</sup>**

Graduação em Química IQ/UNICAMP; Mestrado em Química Analítica IQ/UNICAMP; Doutorado em Química Analítica IQ/UNICAMP.

**Marta Cristina Teixeira Duarte<sup>(1)</sup>**

Bacharelado em Ciências Biológicas UNESP/Rio Claro; Mestrado em Biologia Vegetal – Bioquímica de organismos UNESP/Rio Claro; Doutorado em Biologia Vegetal – Bioquímica de organismos UNESP/Rio Claro.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Alexandre Caselatto, 999- Vila Betel – Paulínia - SP - CEP: 13140-000 - Brasil - Tel: (1) 2139 – 2872 e-mail: [ponezi@cpqba.unicamp.br](mailto:ponezi@cpqba.unicamp.br)

### RESUMO

Vários trabalhos na literatura científica vêm apontando a presença de fármacos em plantas de tratamento de efluentes, águas superficiais, águas oceânicas, lençóis freáticos e em alguns casos águas de abastecimento. As concentrações destes produtos nas amostras ambientais variam de concentrações de nanograma por litro (ng/L) ou micrograma por litro ( $\mu$ g/L). Atualmente, ainda não são bem conhecidos o comportamento e destino dos fármacos e de seus metabólitos no ambiente aquático, no entanto já é evidenciado que neste ambiente não é necessário a presença de grandes concentrações para provocar alterações nos organismos aquáticos. Um exemplo disso é o hormônio 17 $\alpha$ -etinilestradiol que na concentração de 1 a 4 ng/L causam distúrbios reprodutivos em peixes. Neste trabalho foi estudado o processo de biodegradação do 17 $\alpha$ -etinilestradiol por um consórcio microbiano isolado do solo. Os ensaios foram realizados pelo método de fermentação, utilizando concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol de 6, 12 e 24  $\mu$ g/mL. Análises quantitativas foram realizadas para monitorar a biodegradação por cromatografia gasosa. Os resultados indicaram que para as concentrações utilizadas durante o período de ensaio, a remoção do 17 $\alpha$ -etinilestradiol foi de 49,7, 57,8 e 44,5%, indicando que os isolados microbianos são capazes de utilizar o composto químico como única fonte de carbono e energia. Os subprodutos gerados durante a fase de degradação não foram monitorados neste trabalho. Outro fator que foi observado é que este composto apresenta um processo de degradação bastante lento e que concentrações muito baixas ( $< 1$  ng/L<sup>-1</sup>) não são passíveis de degradação podendo assim suspeitar que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol pode estar sendo acumulado no ambiente e com grande potencial de biomagnificação.

**PALAVRAS-CHAVE:** HORMÔNIO; 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL; BIODEGRADAÇÃO.

### INTRODUÇÃO

Estima-se que o consumo de fármacos no mundo está na ordem de algumas centenas de toneladas por ano. Dentre estes podemos citar mais de 3000 tipos de substâncias diferentes como analgésicos e antiinflamatórios, contraceptivos, antibióticos, beta-bloqueadores, reguladores de lipídeos e muitos outros. Os fármacos são dispostos no ambiente após sua aplicação na sua forma nativa ou seus metabólitos contaminando os ambientes aquáticos por diferentes rotas (FENT et al 2006). Uma destas rotas está associada ao consumo humano que após sua ingestão estes são excretados e dispostos no ambiente através do esgoto (HOLM et al, 1995). Já na estação de tratamento de esgoto (ETE), muitos destes compostos, não são biodegradados resultando na contaminação de rios, lagos e outros corpos hídricos. Vários trabalhos na literatura científica vêm apontando a presença de baixos níveis de medicamentos em vários continentes em plantas de tratamento de efluentes, águas superficiais, águas oceânicas, lençóis freáticos e em alguns casos águas de abastecimento (FENT et al 2006).



As concentrações destes produtos nas amostras ambientais variam de concentrações de nanograma por litro (ng/L) e micrograma por litro ( $\mu\text{g/L}$ ) (ROUTLEDGE et al., 1998; SHORE et al., 1993; FERNANDES, 2006). Atualmente, ainda não são bem conhecidos o comportamento e destino dos fármacos e de seus metabólitos no ambiente aquático, no entanto já é evidenciado que neste ambiente não é necessário a presença de grandes concentrações para provocar alterações nos organismos aquáticos. Um exemplo disso é o hormônio  $17\alpha$ -etinilestradiol que na concentração de 1 a 4 ng/L causam distúrbios reprodutivos em peixes (FENT et al 2006).

Propriedades químicas como a baixa volatilidade destes compostos indica que sua distribuição no ambiente acontece principalmente através da água, mas também por dispersão na cadeia alimentícia. Um outro fator importante é o potencial de bioacumulação destes compostos determinado pelo coeficiente de log Kow, conferindo a estes a capacidade de ser lipofílicos (maior capacidade de bioacumulação) ou hidrossolúveis (maior capacidade de distribuição ambiental) (FENT et al 2006).

Dentre estes compostos podemos destacar a presença de substâncias químicas que podem interferir de maneira adversa no sistema endócrino de humanos e animais de vida selvagem. Várias substâncias químicas são potencialmente capazes de causar esta interferência e são comumente conhecidas na literatura como disruptores endócrinos (EDC's) (COLBORN et al., 1993; Et de Bergeron al., 1994; Al de et de verruma., 1995; JOBLING et al., 1995; LEE *et al.*, 2002). Dentre estas substâncias podemos citar vários compostos como os agrotóxicos organoclorados, alquilfenóis, bisfenol A, estrógenos sintéticos como o  $17\alpha$ -etinilestradiol e estrógenos naturais como estradiol, (TYLER et al., 1998). Os disruptores endócrinos são definidos pela U.S. Food and Drug Administration como “agentes exógenos que interfere com a síntese, secreção, transporte, ação de ligação ou eliminação do hormônio natural no corpo, os quais são responsáveis para a manutenção da homeostasi, reprodução, desenvolvimento e comportamento”, interferindo no funcionamento normal de algumas tarefas do sistema endócrino (SUIDAN, et al., 2005).

O hormônio  $17\alpha$ -etinilestradiol presentes nos contraceptivos apresentam uma dosagem de 20 a 50  $\mu\text{g}$  em cada pílula o qual deve ser ingerido diariamente. Após sua administração, este composto é parcialmente absorvido pelo organismo e excretado no esgoto na proporção de 16% na urina e 9% das fezes na forma conjugada com outros compostos. Uma vez na planta de tratamento de esgoto esta substância é separada da forma conjugada, revertendo assim para a forma ativa novamente (SUIDAN, et al., 2005). Vários autores relatam que o  $17\alpha$ -etinilestradiol é parcialmente removido durante o processo de biodegradação por lodo ativados e com uma taxa alta de reposição através da atividade antrópica, tornando este composto como recalcitrante (FENT et al 2006; SUIDAN, et al., 2005; DAUGHTON, 2004; TYLER et al., 1998).

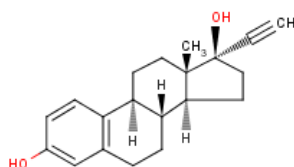
Uma vez no ambiente, a ação do hormônio sob o ecossistema aquático é: disfunção do sistema hormonal, deformidades de nascimento, diminuição da fertilidade, anormalidades metabólicas e feminilização de aves, peixes e mamíferos aquáticos (FERNANDES, 2006).

O objetivo deste trabalho é de encontrar bactérias capazes de utilizar o  $17\alpha$ -etinilestradiol como fonte de carbono e energia e estudar o processo de biodegradação através de cromatografia gasosa na tentativa de identificar compostos formados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Químicos

O  $17\alpha$ -etinilestradiol (CAS 57-63-6) foi adquirido da Sigma ( $17\alpha$ -etinilestradiol mínimo 98% HPLC), a estrutura química da substância esta apresentada na Figura 1 e as principais características físicas estão apresentadas na Tabela 1.



**Figura 1.** Estrutura molecular do 17α-etinilestradiol.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do 17α –etinilestradiol. [C20-H24-O2]

Propriedades físicas	Valor	Unidade	Temp (C°)
Massa molar	296,41	-	-
Ponto de ebulição	183	Graus C	-
log P (octanol-água)	3.67	-	-
Solubilidade em água	11.3	mg/L	27
Pressão de vapor	2.67e-09	mm Hg	25
Constante de Henry's	7.94e-12	atm-m <sup>3</sup> /mole	25
Constante Atmosférica OH	1.25e-10	cm <sup>3</sup> /molecula-sec	25

Sulfato de sódio anidro (Merck) foi utilizado para a secagem dos extratos orgânicos. O acetato de etila (Merck) foi utilizado para a extração do composto. Todas as vidrarias utilizadas durante os experimentos foram lavadas com solventes de grau HPLC antes do uso.

#### Avaliação do potencial de biodegradação do 17α-etinilestradiol

A avaliação do potencial de biodegradação do 17α-etinilestradiol foi estimada através do programa de modelagem QSAR (ECOSAR) utilizado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Este programa tem sido extensivamente utilizado e validado por diversos pesquisadores em seus trabalhos (NABHOLZ et al., 1993; ZEEMAN et al., 1995; MOORE et al., 2003; SANDERSON et al., 2004).

#### Escolha do local para a coleta das amostras de solo.

As amostras de solo foram coletadas nas proximidades do CPQBA/UNICAMP localizado no município de Paulínia/SP (latitude sul 20° 48'; longitude oeste 47° 07'; altitude 669m), classificado como “latossolo vermelho eutrófico típico” em quatro pontos diferentes: a) próximo a uma Mina, onde o local apresenta características de mata ciliar, b) no Campo experimental agrícola, local destinado ao cultivo de plantas medicinais e aromáticas. O solo neste local apresentava baixa umidade; c) em uma área de cultivo de hortaliças e d) num jardim com plantas ornamentais, nos dois últimos casos os solos estão sempre sendo umedecidos e em constante manutenção com adubos.

Procuramos escolher locais com características distintas e com presença de vegetais sendo feita a coleta das amostras próximas às áreas de rizosferas objetivando maior possibilidade de encontrarmos bactérias viáveis capazes de promover a biodegradação do fármaco selecionado.

#### Coleta e enriquecimento de solo para isolamento de microrganismos.

Amostras de solo agrícola foram coletadas na camada superficial do solo (10 cm), acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório. As amostras de solo foram submetidas a um pré-processamento onde cerca de 100 g desse solo foi umedecido com água destilada e disposto em estufa bacteriológica à 28°C (Fanen modelo 520), com ausência de luz, em frascos de Erlenmeyer por um período de 24 horas. Após este período o solo foi submetido ao enriquecimento ou fortalecimento dos microrganismos presentes através da adição por



aspersão de meio de cultura líquido (MS) e caldo nutritivo, ambos descritos nas Tabelas 2 e 3 por um período de 10 dias com intervalo de umidificação do solo a cada 2 dias.

Este processo teve como objetivo a adição de nutrientes para o estímulo do desenvolvimento dos microrganismos presentes nestas amostras como também manter certo grau de atividade de água nestes solos. A umidade do solo foi mantida através de observação da capacidade de campo, que pode ser determinada pelo método do torrão (COSTA, 1983).

**Tabela 2.** Meio de cultivo MS.

Composto	Concentração (g/L)
Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ )	3,0
Mono Fosfato de Potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,0
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ )	0,5
Sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4$ )	0,01
Cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ )	0,5

Fonte: Mello & Azevedo, 1997.

**Tabela 3.** Caldo Nutritivo.

Composto	Concentração (g/L)
Peptona	3,0
Extrato de Malte	5,0

#### Isolamento dos microrganismos do solo.

Amostras de solo de 10g de cada tipo de solo foram diluídas em 100mL de solução salina (0,08%) agitadas e centrifugadas a 10.000 RPM 10 minutos 4°C (Incubras modelo Spin VI). Para o isolamento dos microrganismos foi tomado 1 mL do sobrenadante das amostras de solo e feita diluições seriadas até  $10^{-6}$  e 100  $\mu\text{L}$  desta última diluição foi plaqueada (pour plate) em meio sólido (Agar nutritivo – Oxoid) e incubados a 37°C por 24 horas.

Com o auxílio de microscópio estereoscópico (Cambridge-instruments modelo Stereo Zoom® 5) foi selecionada as colônias morfológicamente diferentes e em seguida foi realizado a purificação destas culturas utilizando o método de semeadura por esgotamento.

#### Identificação das colônias metabolicamente ativas

Amostras das colônias isoladas na etapa anterior foram transferidas para tubo de ensaio contendo 10mL de solução salina (0,08%) e agitada vigorosamente. Novamente foi realizado diluições seriadas e 100  $\mu\text{L}$  da última diluição foi plaqueadas em meio sólido (Agar) com a presença do fármaco e adicionado 25mg/L de um indicador de atividade metabólica, o TTC (Cloreto de Trifenil Tetrazolium).

As colônias isoladas foram identificadas através de taxonomia convencional. A metodologia utilizada foi à avaliação de características fisiológicas e metabolismo bioquímico pela taxonomia clássica convencional, associada ao sistema de testes rápidos de identificação. A identificação é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados citados na literatura de referência. As análises foram realizadas nos laboratórios da Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello. Os resultados têm significação restrita e se aplicam somente às culturas recebidas para análise.

#### Ensaio de biodegradação e preparação das amostras e análises cromatográficas

Foi pesado 10g de solo e depois resuspendido em 50 mL de solução salina 0,08% (cloreto de sódio), a suspensão foi agitada e colocada no sonicador três vezes com o tempo de 1 minuto cada, logo em seguida foi filtrada em gaze hidrófila e a parte líquida foi inoculada em meio de cultura simples (caldo nutriente).



Para a inoculação do teste de degradação foi utilizado o meio mínimo preparado com as seguintes concentrações de sais: 1,6g fosfato de potássio monobásico, 0,2g fosfato de potássio dibásico, 1g sulfato de amônia, 0,2g sulfato de magnésio, 0,01g sulfato ferroso, 0,1 cloreto de sódio e 0,02g cloreto de cálcio, para um litro de água destilada.

A biodegradação foi realizada pelo método de fermentação, utilizando as seguintes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol: 6  $\mu$ g/mL, 12  $\mu$ g/mL e 24  $\mu$ g/mL, a partir da solução estoque, preparada pela forma da dissolução do 17 $\alpha$ -etinilestradiol em dimetilsulfoxido, na concentração de 0,3 mg/mL. As concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, foram adicionadas ao meio mínimo e em seguida adicionou-se 1 mL da suspensão de bactéria.

As amostras ficaram sobre agitação durante 16 dias na temperatura de 30°C com rotação de 150 rpm. As alíquotas foram retiradas nos tempos de 24, 96, 168, 240, 312 e 384 horas, e foram filtradas em membrana de unidades filtrante com diâmetro 0,22  $\mu$ m (Millipore).

Na extração da substância do meio foi utilizado o acetato de etila, o solvente foi adicionado na amostra na relação de 1:1, em seguida agitou-se, formando duas fases (solvente e amostra) a fase do solvente foi coletada e transferida para um balão volumétrico, esse processo foi realizado três vezes. O balão foi levado a um rota- evaporador para a evaporação do solvente, com agitação de 50 rpm,

O resíduo foi ressuspensionado em acetato de etila e transferido para um balão volumétrico de 5 mL, foi acrescentado 1 mL de dibutilftalato para a curva padrão, sendo o volume foi completado com o acetado de etila.

A análise quantitativa foi realizada em um Cromatógrafo a gás modelo HP-6890 acoplado ao detetor seletivo de massas modelo HP-5975 em coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), a quantificação foi no modo SIM (Single ion Monitoring) Lee and Peart, 1998.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análise da biodegradabilidade do 17 $\alpha$ -etinilestradiol através do ECOSAR.**

O objetivo desta análise foi avaliar o potencial de risco deste fármaco no ambiente baseado nos seguintes aspectos: (1) remoção em plantas de tratamento de esgoto, (2) potencial de bioacumulação.

O programa STPWIN (EPIWIN v3.10) foi utilizado para estimar através do modelo de fugacidade deste composto sua remoção em plantas de tratamento de esgoto. Este modelo é baseado no modelo de fugacidade de Toronto descrito por CLARK et al., 1995, onde através das propriedades físicas como massa molar, constante de Henry, coeficiente de partição Log octanol-água e vários parâmetros de volatilização estimam o comportamento de uma determinada substância quanto sua volatilização, a absorção pelo lodo e biodegradação automaticamente à temperatura de 25°C. O programa STPWIN consiste em modelagem do tratamento primário e secundário de uma planta de tratamento de esgoto (tanque primário, tanque de aeração e tanque de sedimentação) como também a capacidade de degradação biótica e abiótica e volatilização sabendo que este parâmetro é um dos maiores contribuintes de remoção de compostos presentes na água.

Os resultados indicam que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol apresenta uma remoção total na planta de tratamento de 17,51% sendo 0,22% biodegradável e 17,29% absorvido pelo lodo. Os resultados mostram também que a parcela volátil deste composto da água é nula.

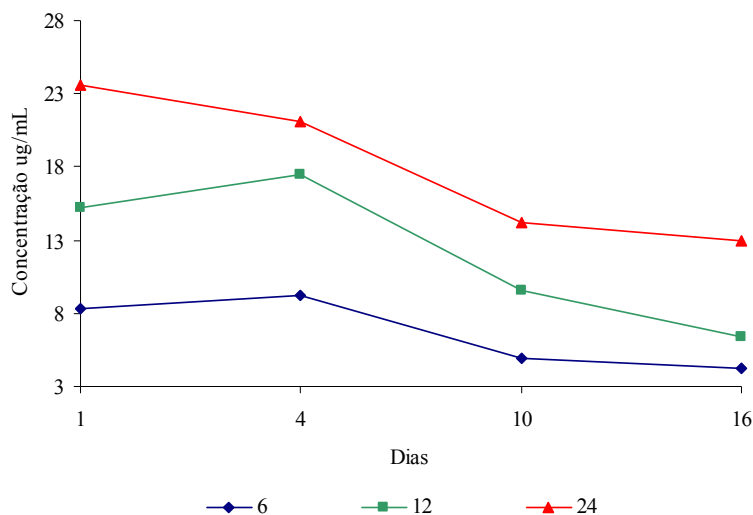
O fator de bioacumulação (FBA) foi baseado no coeficiente de partição Log octanol-água estimado pelo programa BCFWIN v 2.17. Os resultados indicam que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol apresenta um FBC > 4 indicando que esta substância possui capacidade de ser altamente acumulativa (Portaria normativa nº 84 do IBAMA, 1996).

### Isolamento de microrganismos

Durante o processo de isolamento de microrganismos a partir da matriz solo foi identificada apenas uma colônia capaz de utilizar o  $17\alpha$ -etinilestradiol como fonte de carbono com bom crescimento da colônia. Esta colônia foi submetida ao processo de purificação por esgotamento em placa e foi constatada a presença de outras colônias bacterianas indicando um consorcio de organismos. A identificação apresentou os seguintes microrganismos: *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingobacterium multivorum* e *Klebsiella oxytoca*.

### Ensaio de biodegradação utilizando os microrganismos isolados

Os ensaios de biodegradação utilizando o consorcio de microrganismos isolados do solo analisados por cromatografia mostraram similaridade para todas as concentrações utilizadas durante o período de ensaio. A remoção do  $17\alpha$ -etinilestradiol foi de 49,7, 57,8 e 44,5% para as concentrações de 6, 12 e 24  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Estes resultados podem ser observados na Figura 2.



**Figura 2** Biodegradação do  $17\alpha$ -etinilestradiol pelo consorcio de microrganismos isolados do solo durante o período de 16 dias. Concentração inicial: 6, 12 e 24  $\mu\text{g/mL}$ .

Os resultados mostram uma similaridade no perfil de degradação do  $17\alpha$ -etinilestradiol pelos microrganismos indicando que estes são capazes de utilizar o composto químico como única fonte de carbono e energia. Podemos observar que embora tenha ocorrido degradação do fármaco este processo não foi completo dentro do período estudado. Os subprodutos gerados durante a fase de degradação não foram monitorados neste trabalho.

Os dados indicam que para todas as concentrações estudadas (6, 12 e 24  $\mu\text{g/mL}$ ) a utilização do  $17\alpha$ -etinilestradiol foi de 54,8, 64,4 e 38,3% respectivamente, indicando que quanto maior a concentração do fármaco menor sua degradabilidade. Outro fator que pode ser observado é que este composto apresenta um processo de degradação bastante lento e que concentrações muito baixas ( $< 1\text{ng/L}^{-1}$ ) não serem passíveis de degradação (JONES et al, 2004). Segundo a literatura científica, o  $17\alpha$ -etinilestradiol é comumente encontrado em rios, águas residuárias e de abastecimento em concentrações reduzidas ( $\text{ng/L}$ ) podendo assim suspeitar que o  $17\alpha$ -etinilestradiol pode estar sendo acumulado no ambiente e com grande potencial de biomagnificação.

Novos estudos estão sendo realizados na Divisão de Microbiologia do CPQBA/Unicamp com o intuito de se verificar qual a menor concentração deste fármaco que é passível de degradação e qual o período necessário para que isso ocorra.





## CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

O 17 $\alpha$ -etinilestradiol apresenta potencial de degradação biológica dentro das condições de ensaios estudadas, no entanto, este processo não foi completo dentro do período estudado.

O consorcio microbiano identificado neste trabalho apresenta um grande potencial de utilização para o processo de degradação deste composto químico. Estudos bioquímicos do processo devem ser melhores estudados objetivando sua aplicação como pós-tratamento de efluentes sanitários.

Com base nas informações científicas de remoção do 17 $\alpha$ -etinilestradiol em estações de tratamento de efluentes, análises cromatográficas devem ser realizadas para se adequar as reais concentrações do 17 $\alpha$ -etinilestradiol presentes e estudar sua biodegradação pelos microrganismos isolados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERNANDES, R. Estudos de remoção de 17  $\alpha$ -etinilestradiol de águas para abastecimento, utilizando dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, CAP e tratamento físico-químico. Tese de Mestrado. 2006
2. Jornal da Unicamp. Outro alerta sobre a água que bebemos. Edição 346. 2006
3. LEE, H.B.; LIU D. Degradation of 17 $\beta$ -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water, Air, and Soil Pollution*. V. 134, p. 353-368. 2002
4. SUIDAN M. T., ESPERANZA M., ZEIN M., *et al.* Challenges in biodegradation of trace organic contaminants – gasoline, oxygenates and sex hormones. *Water Environmental*. Vol 77. 2005
5. TERNES, T. A.; ANDERSEN H.; GILBERG D. *et al.* Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*. Vol. 74 p. 3498-3504. 2002
6. FENT, K; WESTON, A. A; CAMINADA, D. - Ecotoxicology of human pharmaceuticals - *Aquatic Toxicology* 76: 122–159-2006.
7. HOLM, J.V., RUGGE, K., BJERG, P.L., CHISTENSEN, T.H., 1995. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic-compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* 29 (5), 1415–1420.
8. FERNANDES, R. Estudos de remoção de 17  $\alpha$ -etinilestradiol de águas para abastecimento, utilizando dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, CAP e tratamento físico-químico. Tese de Mestrado. 2006
9. LEE, H.B.; LIU D. Degradation of 17 $\beta$ -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water, Air, and Soil Pollution*. V. 134, p. 353-368. 2002
10. SUIDAN M. T., ESPERANZA M., ZEIN M., *et al.* Challenges in biodegradation of trace organic contaminants – gasoline, oxygenates and sex hormones. *Water Environmental*. Vol 77. 2005
11. TERNES, T. A.; ANDERSEN H.; GILBERG D. *et al.* Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*. Vol. 74 p. 3498-3504. 2002
12. CLARK, B; HENRY, J.G., MACKAY, D., 1995. Fugacity analysis and model of organic chemical fate in a sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1488–1494.
13. MOORE, D.R.J., BRETON, R.L., MacDONALD, D.B., 2003. A comparison of model performance for six quantitative structure–activity relationship packages that predict acute toxicity to fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1799–1809.
14. NABHOLZ, V.J., CLEMENTS, R.G., ZEEMAN, M.G., OSBORN, K.C., WEDGE, R., 1993. Validation of structure activity relationships used by the USEPA's office of pollution prevention and toxics for the environmental hazard assessment of industrial chemicals. In: Gorsuch, J.W., Dwyer, F.J., Ingersoll, C.G., LaPoint, T.W. (Eds.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment*, vol. 2, ASTM, 1216. 1993. ASTM STP 1216, American Society for Testing and Materials, PA, USA, pp. 571–591.
15. ZEEMAN, M., AUER, C.M., CLEMENTS, R.G., NABHOLZ, J.V., BOETHLING, R.S., 1995. U.S. EPA regulatory perspectives on the use of QSAR for new and existing chemical evaluations. *SAR QSAR Environ. Res.* 3, 170–201.
16. BRASIL, leis, decretos, etc. 1996. Portaria normativa IBAM nº84, de 15/12/1996. Dispõe sobre procedimentos para registro e avaliação do PPA. Publicada no D.O.U. em 18/10/1996 e 23/10/1996.
17. MELLO, I S. de; AZEVEDO, J. L. de, eds. Microbiologia ambiental. Jaguariúna: Embrapa \_ CNPMA, 1997. 440p.



18. LEE, H. B. and PEART, T. E.: 1998, 'Determination of  $17\beta$ -estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry', *J. Assoc. Off. Anal. Chem. International* 81, 1209–1216.
19. JONES, O. A. H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Potential ecological and human health risk associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Critical reviews in toxicology*, 34(4): 335-350, 2004.