



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Fernanda Pereira Chaves

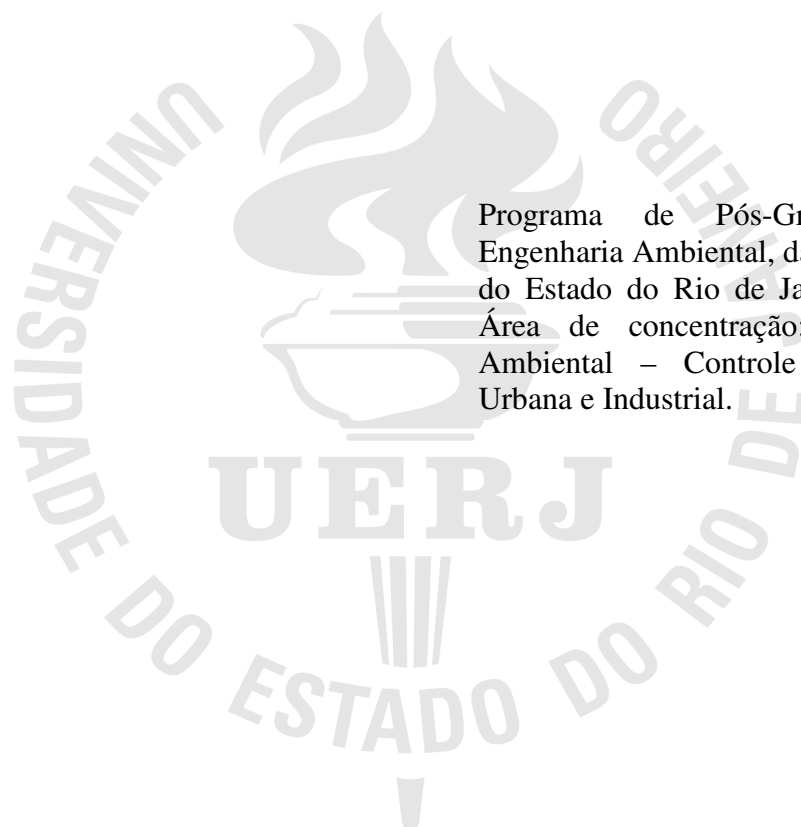
**Estudo da eficiência dos processos Cl/UV e H₂O₂/UV na degradação de
bisfenol-A, 17 β – estradiol e 17 α – etinilestradiol:
avaliação da atividade estrogênica e toxicidade**

Rio de Janeiro

2018

Fernanda Pereira Chaves

**Estudo da eficiência dos processos Cl/UV e H₂O₂/UV na degradação de bisfenol-A, 17 β
– estradiol e 17 α – etinilestradiol: avaliação da atividade estrogênica e toxicidade**



Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).
Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientador: Prof^ª. Dr. Daniele Maia Bila

Coorientador: Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

C512 Chaves, Fernanda Pereira.
Estudo da eficiência dos processos Cl/UV e H2O2/UV na
degradação de bisfenol A, 17 β - estradiol e 17 α - etinilestradiol:
avaliação da atividade estrogênica e toxicidade / Fernanda Pereira
Chaves. – 2018.
135f.

Orientador: Daniele Maia Bila.
Coorientador: Enrico Mendes Saggioro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Poluição - Teses. 3. Água -
Purificação - Teses. 4. Testes de toxicidade - Teses. I. Bila, Daniele
Maia. II. Saggioro, Enrico Mendes. III. Universidade do Estado do Rio
de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 62:502.3

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,
desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fernanda Pereira Chaves

**Estudo da eficiência dos processos Cloro/UV e H₂O₂/UV na degradação de Bisfenol-A,
17 β – Estradiol e 17 α – Etinilestradiol: avaliação da atividade estrogênica e toxicidade**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).
Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Dra. Daniele Maia Bila (Orientadora)

Faculdade de Engenharia – UERJ

Dr. Enrico Mendes Saggiaro (Coorientador)

ENSP - FIOCRUZ

Dra. Márcia Walquiria de Carvalho Dezotti

COPPE/UFRJ

Dra. Isabelli do Nascimento Dias

EQ/UFRJ

Rio de Janeiro

2018

Com amor e carinho, dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu forças e saúde para chegar até aqui. A meus maiores amores nessa vida Lúcia e Fábio, sem eles eu nada seria, obrigada por me proporcionarem condições financeiras e emocionais para concluir não somente essa mas todas as etapas da minha vida e por acreditarem no meu potencial.

A meu amor Hyrlan por acreditar em mim mais do que eu mesma, por renovar minhas forças sempre que elas se esgotavam e por todos seu amor e paciência.

A minha avó Maria, que desde meu nascimento cuidou de mim como se fosse sua filha, me dando sempre muito amor e carinho.

A meu orientador Enrico pois sem ele meu trabalho não seria possível, seu cuidado, atenção e dedicação foram imprescindíveis nessa etapa, se tornando um exemplo de profissional e humildade.

Agradeço também a minha orientadora Daniele Bila pela confiança depositada e por me acompanhar desde meus primeiros passos na vida acadêmica, como aluna de iniciação científica.

Aos amigos do Les Gisele, Louise, Ana e Sidney. A meus amigos da toxicidade Rachel, Vanessa e em especial Morgana que me acolheu com tanto carinho desde minha chegada ao Cesteh.

A meus tão valiosos amigos de vida Camila, Renata, Cristiane, Carolina e Jacqueline.

A toda minha família.

Muito Obrigada!

RESUMO

CHAVES, Fernanda Pereira. *Estudo da eficiência dos processos Cl/UV e H₂O₂/UV na degradação de bisfenol-A, 17β – estradiol e 17α – etinilestradiol: avaliação da atividade estrogênica e toxicidade*. 2018. 135 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Diversas substâncias são classificadas como desreguladores endócrinos, tais como pesticidas, produtos químicos empregados e produzidos por indústrias e estrogênios naturais e sintéticos. Essas substâncias interferem na produção, liberação, metabolismo e eliminação de hormônios, podendo ainda mimetizar ou bloquear a ação desses. Tendo em vista que esses compostos podem estar presentes em diversas matrizes ambientais, como água, solo, esgoto, sedimentos e lixiviados, estudos para promover a eliminação desses compostos tem crescido cada vez mais. Os tratamentos convencionais de água e esgoto não promovem a completa eliminação desses compostos, sendo necessário o desenvolvimento de novas tecnologias, dentre elas os processos oxidativos avançados, que promovem a remoção de compostos através da geração de radicais hidroxila. O objetivo do estudo foi avaliar a degradação dos desreguladores endócrinos bisfenol A (BPA), 17β-estradiol (E2) e 17α-etinilestradiol (EE2) pelos processos H₂O₂/UV e Cl/UV, investigando a matriz aquosa (água ultrapura, água residual e água de torneira), a radiação UVA e UVC, a concentração dos oxidantes e valores de pH em 5, 7 e 9. Além da remoção dos compostos, foi investigada a formação dos produtos intermediários estrogênicos pela determinada da atividade estrogênica das amostras antes e após os processos de tratamento pelo ensaio *in vitro* ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*), que utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. Ensaios de ecotoxicidade crônica com os organismos-testes *Ceriodaphnia dubia* e *Raphidocelis subcapitata* e parâmetros físico-químicos também foram determinados. Os processos H₂O₂/UV e Cl/UV apresentaram diferentes eficiências de remoção dos desreguladores endócrinos BPA, E2 e EE2 de acordo com as condições experimentais adotadas. As amostras antes do tratamento apresentaram atividade estrogênica com valor de EQ-E2 de $265 \pm 6 \mu\text{g.L}^{-1}$, entretanto após os tratamentos a atividade estrogênica foi removida para valores abaixo do limite de quantificação após 5 e 20 minutos de reação para Cl/UV e H₂O₂/UV, respectivamente. Os ensaios toxicológicos demonstraram toxicidade para os dois organismos-teste e processos de tratamento analisados.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; ensaio *in vitro* YES; toxicidade crônica.

ABSTRACT

CHAVES, Fernanda Pereira. *Study of the efficiency of Cl/UV and H₂O₂/UV processes in the degradation of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinyl estradiol: evaluation of estrogenic activity and toxicity*. 2018. 135 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Several substances are classified as endocrine disrupters, such as pesticides, active chemicals and those produced by natural and synthetic industries and estrogens. Chemicals interfere with the production, release, metabolism and production of hormones, and may mimic or block such action. Considering that these compounds may be present in several environmental matrices such as water, soil, sewage, sediments and leachate, studies to promote the elimination of these compounds have been growing more and more. Conventional treatments of water and sewage do not promote the complete elimination of these compounds, being necessary the development of new technologies, among them the advanced oxidative processes, that promote the removal of compounds through the generation of hydroxyl radicals. The objective of the study was to evaluate the degradation of the endocrine disrupters bisphenol A (BPA), 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinyl estradiol (EE2) by H₂O₂/UV and Cl / UV processes, investigating the aqueous matrix (ultrapure water, and tap water), UVA and UVC radiation, oxidant concentration and pH values at 5, 7 and 9. In addition to the removal of the compounds, the formation of the estrogen intermediates was investigated by the determination of the estrogenic activity of the samples before and after the treatment processes by the Yeast Estrogen Screen (Yeast Estrogen Screen), which uses the genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Chronic ecotoxicity tests with test organisms *Ceriodaphnia dubbia* and *Raphidocelis subcapitata* and physical-chemical parameters were also determined. H₂O₂/UV and Cl/UV processes presented different removal efficiencies of BPA, E2 and EE2 endocrine disrupters according to the experimental conditions adopted. The pre-treatment samples presented estrogenic activity with EQ-E2 value of $265 \pm 6 \mu\text{g.L}^{-1}$, however after the treatments the estrogenic activity was removed to values below the limit of quantification after 5 and 20 minutes of reaction for Cl/UV and H₂O₂/UV, respectively. The toxicological tests demonstrated toxicity for the two test organisms and treatment processes analyzed.

Keywords: Endocrine disrupters; in vitro assay YES; chronic toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de atuação os DEs: (a) Resposta natural, (b) Efeito agonista e (c) Efeito antagonista.....	23
Figura 2: Meios de contaminação por desreguladores endócrinos	24
Figura 3: Estrutura química do BPA.....	31
Figura 4: Estrutura química do E2.....	32
Figura 5: Estrutura química do EE2.....	33
Figura 6: Estrutura química comum dos esteróides.....	35
Figura 7: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante para o Ensaio YES.....	37
Figura 8: Sistema reacional utilizado nos experimentos fotólise e fotodegradação Cl/UV e H ₂ O ₂ /UV.....	47
Figura 9: Esquema experimental para fotodegradação H ₂ O ₂ /UV.....	51
Figura 10: Esquema experimental para fotodegradação Cloro/UV.....	52
Figura 11: Esquema experimental ensaio <i>in vivo</i> YES.....	55
Figura 12: Ilustração da placa de análise com amostra, branco e controle positivo (17 β-estradiol)	57
Figura 13: Degradação dos DEs BPA, E2 e EE2 por fotólise em água ultrapura (a) UVA; (b) UVC; condições iniciais: 100 µg.L ⁻¹ de cada DE, T=25°C, pH = 5.....	61
Figura 14: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H ₂ O ₂ /UVA em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: [H ₂ O ₂] = 3 mg.L ⁻¹ ; T = 25°C.....	64
Figura 15: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H ₂ O ₂ /UVA em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: [H ₂ O ₂] = 30mg.L ⁻¹ ; T=25°C.....	65
Figura 16: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H ₂ O ₂ /UVC em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: [H ₂ O ₂] = 3 mg.L ⁻¹ ; T=25°C.....	67
Figura 17: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H ₂ O ₂ /UVC em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: [H ₂ O ₂] = 30 mg.L ⁻¹ ; radiação UVC; T=25°C.....	68
Figura 18: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H ₂ O ₂ /UVC em água residual de estação de tratamento de esgoto (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: [H ₂ O ₂] = 3mg.L ⁻¹ ; T=25°C.....	72
Figura 19: Curva dose-resposta do controle positivo 17β-estradiol no ensaio YES.....	75
Figura 20: Valores de EQ-E2 (µg.L ⁻¹) em 0, 5 e 20 minutos de tratamento H ₂ O ₂ /UVC;	

condições iniciais: $[H_2O_2] = 3 \text{ mg.L}^{-1}$, pH 5, 7 e 9.	76
Figura 21: Resultados dos testes de toxicidade crônica com <i>Raphidocelis subcapitata</i> durante a fotodegradação H_2O_2/UVC ; condições iniciais: $[H_2O_2] = 3 \text{ mg.L}^{-1}$, pH 9.....	79
Figura 22: Degradação de BPA, E2 e EE2 por cloração em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	81
Figura 23: Degradação de BPA, E2 e EE2 por cloração em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	82
Figura 24: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVA em água ultrapura; (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	85
Figura 25: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVA em água ultrapura; (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	86
Figura 26: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVC em água ultrapura; (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	88
Figura 27: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVC em água ultrapura; (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	89
Figura 28: Degradação de BPA, E2 e EE2 por cloração em água na torneira (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1,4 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	91
Figura 29: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVC em água na torneira (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1,4 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	92
Figura 30: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVC em água residual de estação de tratamento de esgoto (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^0C$	94
Figura 31: Valores de EQ-E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em 0, 2,5 e 5 minutos de tratamento Cl/UVC ; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$, pH 5, 7 e 9.....	97
Figura 32: Resultados dos testes de toxicidade crônica com <i>Raphidocelis subcapitata</i> durante a fotodegradação Cl/UVC ; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$, pH 7.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos classificados como desreguladores endócrinos.....	21
Tabela 2: Ocorrência do BPA, E2 e EE2 em matrizes aquosas em diferentes regiões do mundo.....	26
Tabela 3: Efeitos dos DEs BPA, E2 e EE2 em animais silvestres.....	29
Tabela 4: Propriedades físico- químicas do BPA.....	31
Tabela 5: Propriedades físico- químicas do E2.....	32
Tabela 6: Propriedades físico- químicas do EE2.....	33
Tabela 7: Potencial de oxirredução de agentes oxidantes.....	40
Tabela 8: Trabalhos relacionados ao estudo com H ₂ O ₂ /UV.....	43
Tabela 9: Trabalhos relacionados ao estudo com Cl/UV.....	45
Tabela 10: Reagentes utilizados nos experimentos.....	46
Tabela 11: Especificações das lâmpadas UV.....	48
Tabela 12: Parâmetros Físico-químicos e microbiológicos utilizados na caracterização da água residual	49
Tabela 13: Condições cromatográficas utilizadas.....	53
Tabela 14: Limites de detecção e quantificação BPA, E2 e EE2.....	54
Tabela 15: Consumo de H ₂ O ₂ no processo H ₂ O ₂ /UVA em água ultrapura dos DEs.....	66
Tabela 16: Consumo de H ₂ O ₂ no processo H ₂ O ₂ /UVC em água ultrapura com os DEs.....	70
Tabela 17: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nos tempos 0, 10, 45 e 90 minutos de tratamento H ₂ O ₂ /UVC em água residual.....	74
Tabela 18: Consumo de H ₂ O ₂ no processo H ₂ O ₂ /UVC em água residual.....	74
Tabela 19: Consumo de cloro no processo de cloração em água ultrapura.....	83
Tabela 20: Consumo de Cloro no processo Cl/UVA em água ultrapura.....	86
Tabela 21: Consumo de cloro no processo Cloro/UVC em água ultrapura.....	90
Tabela 22: Consumo de cloro no processo de cloração e Cl/UVC em água da torneira.....	93
Tabela 23: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nos tempos 0, 10, 45 e 90 minutos de tratamento Cl/UVC em água residual.....	96
Tabela 24: Consumo de Cloro no processo Cl/UV em água residual.....	96
Tabela 25: Eficiência de remoção dos DEs pelos processos de fotólise, H ₂ O ₂ /UV e Cl/UV.....	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Aspectos positivos e negativos na utilização dos processos oxidativos avançados.....	41
Quadro 2: Processos oxidativos avançados.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
Ab _S corrigida	Absorbância corrigida
ATZ	Atrazina
BBP	Butilbenzilftalato
BDE 47	2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter
BDE 154	2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter
BDE octa	2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter octabromodifenil éter
BPA	Bisfenol A
CE ₅₀	Concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão (*)
CE50	Concentração que elucida 50% da resposta
CG/EM	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE/FLU	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
CLAE/FLU	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector ultravioleta
Cl ⁻	Cloreto
CL/EM	Cromatografia Líquida com espectrômetro de massa
COT	Carbono orgânico total
CPRG	<i>chlorophenol red-β-D-galactopyranoside</i>
CT	Carbono total
DBP	Di-n-butilftalato
DBPs	Subprodutos de desinfecção
DCHP	Dicicloexiloftalato
DDT	2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano
DEHP	Di-2-(2-etil-exil)ftalato
DEP	Dietil ftalato
DEs	Desreguladores endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DIBP	Di-iso-butilftalato

DMP	Dimetil ftalato
DOP	Di-n-octilftalato
DPa	Desvio padrão
E1	Estrona
E2	17 β - estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α – etinilestradiol
EQ-E2	Equivalente 17 β -estradiol
ETDI	Estação de tratamento de despejos industriais
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FLU	Fluorescência
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBP	Ibuprofeno
IC	Carbono inorgânico
HAAs	Ácido haloacético
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NP	Nonilfenol
O ₃	Ozônio
OGM	Organismo geneticamente modificado
HO•	Radical hidroxila
PBB	Polibromobifenila
POA	Processo oxidativo avançado
ppb	Partes por bilhão
REh	Receptor de estrogênio humano
ROS	Reactive oxygen species
TBT	Tributilestanho
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina
TCDF	2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano
THMs	trialometanos
TiO ₂	Dióxido de titânio
TN	Nitrogênio total
TPT	Trifenilestanho

USEPA *United State Environmental Protection Agency*

UV ultravioleta

USEPA United State Environmental Protection Agency

VTG Vitelogenina

YES Yeast estrogen screen

(*) Definição de CE₅₀ para o ensaio YES

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. OBJETIVOS	19
1.1. Geral	19
1.2. Específicos	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Desreguladores endócrinos	20
2.2. Ocorrência de desreguladores endócrinos no meio ambiente	23
2.3. Fontes de exposição dos desreguladores endócrinos no meio ambiente	27
2.4. Efeitos deletérios em organismos devido a exposição dos desreguladores endócrino.....	28
2.5. Bisfenol A.....	30
2.6. 17 β - Estradiol	31
2.7. 17 α - Etinilestradiol	32
2.8. Métodos analíticos para determinação de desreguladores endócrinos em matrizes ambientais.....	33
2.9. Atividade estrogênica	34
2.10. Ensaio utilizados na avaliação da atividade estrogênica.....	35
2.10.1. Ensaio <i>in vitro</i> Yes	36
2.11. Ensaio Ecotoxicológicos	39
2.12. Tratamento para remoção dos desreguladores endócrinos em matrizes aquosas.....	40
2.12.1. Processos oxidativos avançados	40
2.12.2. Fotólise	42
2.12.3. Fotodegradação H ₂ O ₂ /UV	42
2.12.4. Fotodegradação Cl/UV	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. Reagentes e materiais	46
3.2. Solução Estoque	47
3.3. Aparatos experimentais	47
3.4. Configuração dos processos oxidativos avançados.....	49
3.4.1. Fotólise	48
3.4.2. Fotodegradação H ₂ O ₂ /UV	50
3.4.3. Fotodegradação Cl/UV	52

3.5. Método cromatográfico para CLAE/FLU	52
3.5.1. Construção da curva analítica.....	53
3.5.2. Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	53
3.6. Avaliação da atividade estrogênica por meio do Ensaio <i>in vitro</i> YES.....	54
3.6.1. Limpeza e descontaminação das vidrarias.....	55
3.6.2. Preparação das soluções utilizadas no ensaio YES.....	56
3.6.3. Cultivo da cepa da levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) recombinante.....	56
3.6.4. Procedimento do ensaio <i>in vitro</i> YES.....	56
3.6.5. Análise dos resultados do Ensaio Yes.....	58
3.7. Ensaio Ecotoxicológicos.....	59
3.7.1. Organismo-teste <i>Ceriodaphnia dubia</i>	59
3.7.2. Organismo-teste alga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Degradação dos desreguladores endócrinos por fotólise.....	61
4.2. Degradação dos desreguladores endócrinos por H ₂ O ₂ /UV.....	63
4.2.1. Matriz água ultrapura.....	63
4.2.1.1. Ausência de radiação.....	63
4.2.1.2. H ₂ O ₂ /UVA.....	63
4.2.1.3. H ₂ O ₂ /UVC.....	67
4.2.2. Matriz água residual.....	71
4.2.3. Ensaio <i>in vitro</i> YES.....	75
4.2.3.1. Controle positivo 17 β-estradiol.....	75
4.2.3.2. Determinação da atividade estrogênica durante processo H ₂ O ₂ /UVC.....	76
4.2.4. Ensaio Ecotoxicológicos.....	78
4.2.4.1. Organismo-teste alga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	78
4.2.4.2. Organismo-teste <i>Ceriodaphnia dubia</i>	79
4.3. Degradação dos desreguladores endócrinos por Cl/UV.....	80
4.3.1. Matriz água ultrapura.....	80
4.3.1.1. Ausência de radiação.....	80
4.3.1.2. Cl/UVA.....	84
4.3.1.3. Cl/UVC.....	87
4.3.2. Água da torneira.....	90
4.3.3. Água residual.....	93
4.3.4. Ensaio <i>in vitro</i> YES.....	97

4.3.5. Ensaio Ecotoxicológicos.....	98
4.3.5.1. Organismo alga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	98
4.3.5.2. Organismo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	99
4.4. Comparação da eficiência de remoção dos DEs por Fotólise, H ₂ O ₂ /UV e Cl/UV.....	100
5. CONCLUSÃO.....	103
SUGESTÕES FUTURAS.....	105
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXO 1 - Protocolo de preparação das soluções do ensaio <i>in vitro</i> YES.....	127
ANEXO 2 - Curvas dose-resposta das amostras de tratamento H ₂ O ₂ /UV.....	129
ANEXO 3 - Curvas dose-resposta das amostras de tratamento Cl/UV.....	130

INTRODUÇÃO

O crescimento e a busca pela qualidade de vida da população têm levado ao desenvolvimento dos mais variados setores da indústria química, gerando grande volume de resíduos sólidos e efluentes, muitos deles com alto risco de contaminação ao ambiente. Apesar de não ser um tema novo, com o aprofundamento de estudos foi possível detectar a presença de contaminantes, não regulamentados, de origem natural ou não, que podem estar presentes na água, incluindo potável e subterrânea, esgoto, sedimentos marinhos, ar e solo, causando riscos à saúde dos seres vivos. Esses compostos são denominados contaminantes emergentes e se apresentam em muitos casos em baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} (KUSTER et al., 2008).

Dentro desse grupo encontram os desreguladores endócrinos (DEs), pertencentes a variadas classes de substâncias, tais como pesticidas, hormônios naturais e sintéticos, ftalatos, fitostrogênicos, bisfenóis, entre outros. São definidos segundo a *Environmental Protection Agency* como: “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” (USEPA, 1997).

A literatura relata que a exposição ambiental ao bisfenol A (BPA), 17 β - estradiol (E2) e 17 α – etinilestradiol (EE2) pode ser nociva à saúde humana. Segundo Teske e Arnold (2008) a presença de EE2 pode causar câncer de próstata em humanos, o E2 é responsável pela alteração funcional das glândulas digestivas em mexilhões (CANESI et al., 2008) enquanto o BPA é suspeito de causar problemas na saúde de período perinatal, infância e vida adulta, incluindo efeitos no processo reprodutivo (ROCHESTER, 2013).

Entretanto, a identificação e quantificação desses compostos não é simples e levou ao desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis que garanta a detecção confiável de compostos em concentrações na ordem de ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MOL et al., 2000). Além disso, é necessário utilizar ensaios *in vivo* e *in vitro* para conhecer o efeito deletérios dessas substâncias nos seres vivos. A utilização conjunta desses métodos permite uma análise completa da presença desses compostos e seus possíveis efeitos no meio ambiente.

Pesquisas também demonstraram que os tratamentos convencionais de água e esgoto normalmente não removem esses compostos, sendo necessário o aprofundamento de técnicas avançadas para sua remoção, tais como os processos oxidativos avançados (LEECH et al., 2009; LIU et al., 2009). Nesse contexto, o presente trabalho busca avaliar a eficiência dos

processos oxidativos avançados $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ e Cl/UV na degradação dos desreguladores endócrinos BPA, E2 e EE2, além dos parâmetros operacionais que influenciam os processos. Além disso, foram realizados ensaios para determinação da atividade estrogênica e ensaios ecotoxicológicos antes, durante e após os tratamentos propostos.

1. OBJETIVOS

1.1. Geral

Avaliar a degradação dos desreguladores endócrinos Bisfenol A (BPA), 17 β -Estradiol (E2) e 17 α -Ethinilestradiol (EE2) pelos processos oxidativos avançados Cl/UV e H₂O₂/UV.

1.2. Específicos

- Avaliar os parâmetros pH, concentração dos agentes oxidantes, fonte luminosa, diferentes matrizes que possam influenciar a degradação dos desreguladores endócrinos pelos processos oxidativos avançados Cl/UV e H₂O₂/UV;
- Avaliar a atividade estrogênica pelo ensaio *in vitro* YES antes, durante e após os processos oxidativos avançados;
- Avaliar a toxicidade crônica pelos ensaios toxicológicos utilizando os organismos-teste *Ceriodaphnia dubia* e *Raphidocelis subcapitata* antes, durante e após os processos oxidativos avançados;
- Avaliar simultaneamente os processos de degradação dos desreguladores endócrinos e de desinfecção de *Escherichia coli* em água residual.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desreguladores endócrinos

A extração, produção e uso em grande escala dos mais diversos produtos químicos tem aumentado a cada ano. Acompanhando esse crescimento, ocorre o desenvolvimento e avanço de novas técnicas analíticas mais sensíveis que detectam com mais confiança os micropoluentes nas diversas matrizes ambientais, como ar, água e solo (LIZ et al., 2012).

Os micropoluentes se referem a substâncias que mesmo encontradas no meio ambiente em baixas concentrações, na ordem de microgramas por litro ($\mu\text{g.L}^{-1}$) ou nanogramas por litro (ng.L^{-1}) podem causar riscos e danos aos organismos. Dentro desse grupo, existe uma classe de substâncias que tem ganhado cada vez mais destaque nas pesquisas científicas, denominada desreguladores endócrinos (FILHO et al., 2006).

A nomenclatura adotada para essas substâncias pode variar de acordo com o autor, sendo também denominadas como perturbadores endócrinos, interferentes endócrinos, ou interferentes hormonais. Quanto a definição de quais substâncias pertencem a essa classe existe no meio acadêmico uma contradição, enquanto alguns autores consideram que os desreguladores endócrinos (DEs) são quaisquer substâncias que causam desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino, independente de atuar ou não diretamente no sítio receptor, outros consideram que os desreguladores são somente as substâncias que interagem diretamente com o sítio receptor (BILA e DEZOTTI, 2007). Segundo a Environmental Protection Agency (USEPA, 1997), um desregulador endócrino é definido como um “agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e ou comportamento dos organismos”.

Os desreguladores endócrinos são classificados quanto sua origem, como substâncias naturais, que incluem os hormônios presentes no corpo humano (estrogênio, progesterona e testosterona) e os fitoestrogênios, provenientes de algumas espécies de plantas como semente de soja ou substâncias sintéticas, e os hormônios sintéticos, como anticoncepcionais, aditivos na alimentação animal, pesticidas, cosméticos, substâncias utilizadas nas indústrias, dentre outros (GHISELLI e JARDIM, 2007). A Tabela 1 (BILA e DEZOTTI, 2007) apresenta diferentes classes de substâncias classificadas como desreguladores endócrino.

Tabela 1: Compostos classificados como desreguladores endócrinos

Ftalatos		Pesticidas	
Dimetil ftalato (DMP)		<u>Pesticidas</u>	<u>Inseticidas</u>
Dietil ftalato (DEP)		Vinclozolina	D DT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano)
di-iso-butil ftalato (DIBP)		Carbendazime	D DE (2,2bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno)
di-n-butil ftalato (DBP)		Penconazol	Deltametrin
butilbenzil ftalato (BBP)		Procloraz	Carbofurano
diciclohexilo ftalato (DCHP)		Propiconazol	
di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP)		Epoxiconazol	
di-n-octil ftalato (DOP)		Procimidona	
Estrogênios naturais		Bisfenol	Agentes terapêuticos e farmacêuticos
Estrona (E1)			Dietilestilbestrol (DES)
17 β -estradiol (E2)		Bisfenol A (BPA)	17 α -etinilestradiol (EE2)
Alquifenóis	Retardante de chama bromado		
Nonilfenol	2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter		Polibromobifenila (PBB)
Nonilfenol etoxilado	(BDE 154)		2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter
Octilfenol	2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter		(BDE 47)
Octilfenoletoxilado	Octabromodifenil éter (BDE octa)		2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter
Parabenos	Policlorados de bifenilas	Organoclorados	
Benzilparabeno	2,4,4'-triclorobifenil	Dibenzo-p-dioxina	
Isobutilparabeno	2,2',5,5'-tetraclorobifenil	TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina)	
Butilparabeno	2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil	TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano)	
n-propilparabeno	2,3',4,4',5-pentaclorobifenil		
etilparabeno	2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil		
Fitoestrogênios		Compostos orgânicos de estanho	
<u>Isoflavona</u> : daidzeína e genisteína	<u>Liganas</u> : metaresinol, enterodiol, enterolactona	Tributilestanho (TBT) trifenilestanho (TPT)	
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos			
Naftalina			
Acenaftileno	Fluoranteno	Benzo[k]fluoranteno	
Acenafteno	Pireno	Benzo[a]pireno	
Fluoreno	Benzo[a]antraceno	Indeno[123-cd]pireno	
Fenantreno	Criseno	Dibenzo[ah]antraceno	

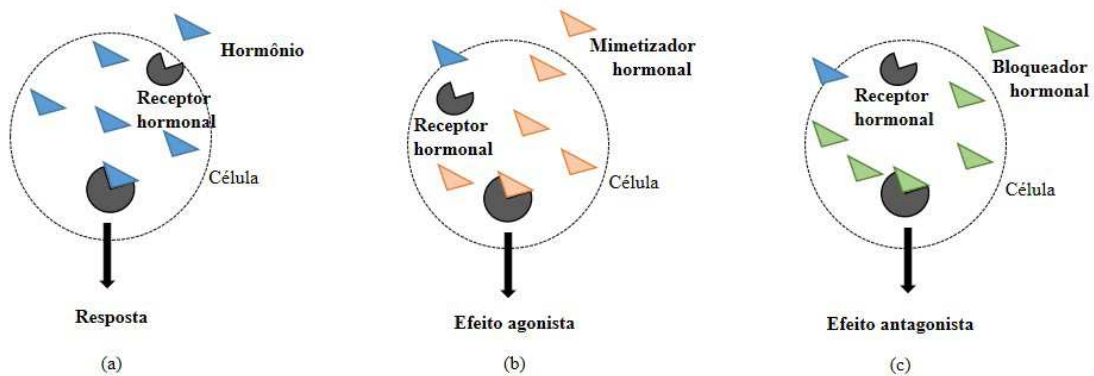
Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti, 2007.

O sistema endócrino é constituído por glândulas presentes ao longo do corpo, dentre elas tireoide, gônadas e glândulas suprarrenais e pelos hormônios por elas sintetizados tais como tiroxina, estrogênios, testosterona e adrenalina. Os hormônios são produzidos e secretados pelas glândulas endócrinas e funcionam como segundos mensageiros, uma vez que ao se ligarem a um receptor específico no interior de uma célula e serem lançados na corrente sanguínea coordenam o funcionamento do organismo, controlando atividades de órgãos completos, níveis de sais e açúcares no sangue, crescimento, desenvolvimento sexual, reprodução, dentre outros (GHISELLI e JARDIM, 2007).

A presença de desreguladores endócrinos num organismo faz com que estabeleça uma competição entre eles e os hormônios naturais, uma vez que ambos podem se ligar aos receptores hormonais. Quando um DE se liga a um receptor esse pode mimetizar, ou seja, substituir o hormônio no organismo, manifestando então um efeito agonista no organismo, uma vez que ele pode enviar sinais diferentes ou fora do tempo, podendo produzir uma resposta mais fraca ou mais forte do que o próprio hormônio produziria (BIRKETT e LESTER, 2003). Um DE também pode agir bloqueando a ação natural de um hormônio, tendo assim um efeito antagonista ou pode ainda alterar os níveis originais de um hormônio natural no corpo e assim afetar funções endócrinas, tais como síntese, transporte, metabolismo (SANTAMARTA, 2001).

Os mecanismos de ação estão representados na Figura 1, onde em (a) os hormônios se encaixam perfeitamente aos receptores e transmitem os sinais indispensáveis as células, (b) os desreguladores ocupam o lugar dos hormônios, se encaixando perfeitamente aos receptores, entretanto enviando sinais diferentes e fora do tempo as células e (c) os desreguladores atuam como bloqueadores dos sinais normais dos hormônios que seriam enviados as células (de BIRKETT & LESTER, 2003).

Figura 1: Mecanismo de atuação os DEs: (a) Resposta natural, (b) Efeito agonista e (c) Efeito antagonista



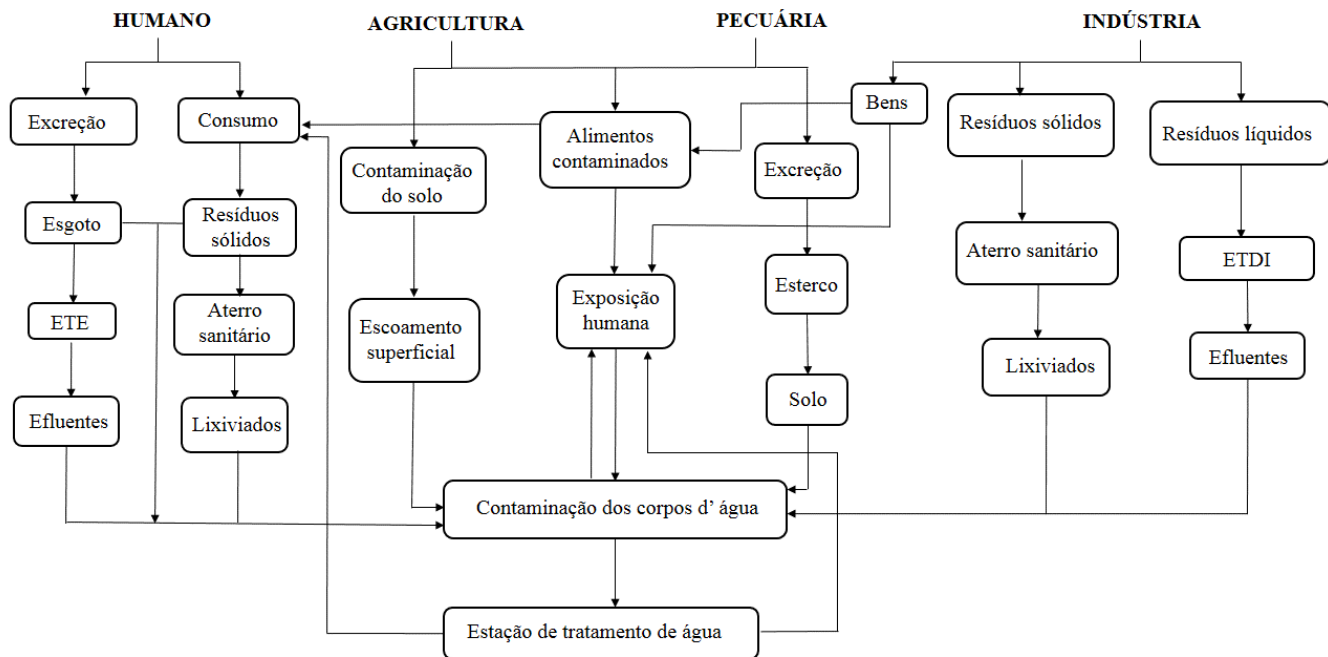
Fonte: Adaptado de BIRKETT & LESTER (2003).

2.2. Ocorrência de desreguladores endócrinos no meio ambiente

O monitoramento da presença de desreguladores endócrinos no meio ambiente tem sido realizado em muitos estudos ao redor do mundo. No ambiente aquático, essas substâncias podem ser encontradas nas águas superficiais e subterrâneas, sedimentos marinhos, solo, efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), lodo biológico das ETE e água potável.

A Figura 2 ilustra as diferentes vias a partir das quais os desreguladores endócrinos entram em contato com organismo humano e ecossistema aquático. O contato humano pode ocorrer através de uso de medicamentos, excreção de hormônios naturais e sintéticos, produtos de limpeza e higiene, assim como bens de consumo. Na agricultura através do uso de pesticidas e agrotóxicos, na pecuária por meio da excreção natural de hormônios, uso de medicamentos e drogas para acelerar o crescimento, entre outros. Por fim, a indústria pode contribuir através do desenvolvimento e venda de medicamentos, bens que possuam plástico, produtos de limpeza e cosméticos e os mais variados bens de consumo (AQUINO, 2013).

Figura 2: Meios de contaminação por desreguladores endócrinos



Fonte: Adaptado AQUINO, 2013.

Os hormônios, naturais ou sintéticos, são excretados do organismo através da urina e das fezes, sendo posteriormente lançados na rede de esgoto, alcançando o meio ambiente. Dessa forma, o principal meio de contaminação de corpos hídricos é o lançamento de água residuária *in natura* ou devido a ineficácia na remoção de micropoluentes em estações de tratamento de esgoto (REIS, 2006).

Johnson et al. (2000) analisou a excreção média diária de hormônios em cinco grupos, sendo eles homens, mulheres durante o período de menstruação, mulheres na menopausa, mulheres em gestação e mulheres que fazem uso de hormônios sintéticos. Os resultados indicam que homens excretam 1,6; 3,9; 1,5 μg por dia de estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3), respectivamente. Enquanto em mulheres menstruadas a taxa de excreção é de 3,5; 8 e 4,8 μg por dia de E2, E1 e E3, respectivamente. No caso de mulheres na menopausa a excreção de E2, E1 e E3 diminui para valores de 2,3; 4 e 1 μg por dia, valores muito abaixo de mulheres durante a gestação onde os valores aproximados alcançam taxas de 259, 600 e 6000 μg por dia de E2, E1 e E3, respectivamente. A excreção de EE2 em mulheres que fazem uso de medicamentos contraceptivos é de 35 μg por dia em média, diminuindo para 27,5 μg por dia em mulheres que estão submetidas a tratamento de reposição hormonal.

Estudos mostram que substâncias como BPA e EE2, foram detectadas em diferentes matrizes aquosas como águas superficiais, esgotos sanitários e efluentes industriais

(MONTAGNER et al., 2011, PEREIRA et al., 2014, TERNER et al. 1999b, LUO et al., 2014). Assim como a presença dos estrogênios naturais E1 e E2, como fonte de atividade estrogênica em muitos efluentes de ETE e águas superficiais em várias partes do mundo (SOLÉ *et al.*, 2003, TERNES *et al.*, 1999a, BELFROID *et al.*, 1999, LOPÉZ e BARCELO, 2001).

O BPA é fracamente estrogênico e frequentemente com potencial de três ou mais ordens de magnitude menores do que os estrogênios E2 e EE2 segundo bioensaios *in vivo* utilizando peixes (BRIAN et al., 2005; VAN DEN BELT et al., 2003). Algumas pesquisas sugerem que E1, E2 e EE2 são os maiores responsáveis pela estrogenicidade dos efluentes de ETE (DESBROW *et al.*, 1998; JOBLING *et al.*, 1998). Entretanto, outras classes de substâncias podem colaborar para elevar o nível de estrogenicidade em matrizes ambientais, tais como compostos orgânicos contendo estanho, o trifenilestanho (TPT), que se acumula não somente na água como também em sedimentos marinhos (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

A Tabela 2 apresenta algumas pesquisas de ocorrência dos desreguladores endócrinos BPA, E2 e EE2 detectados no meio ambiente e suas faixas de concentrações determinadas.

Tabela 2: Ocorrência do BPA, E2 e EE2 em matrizes aquosas em diferentes regiões do mundo

Substância	Concentração (ng.L⁻¹)	Matriz	Localização	Referência
BPA	1290 – 84110	Esgoto sanitário	Curitiba (PR)	FROEHNER, 2011
	56 – 309	Esgoto sanitário	Belo Horizonte (MG)	QUEIROZ et al., 2012
	4 – 377	Água superficial	China	YANG, J. et al., 2014
	99	Água potável	Canadá	KLEYWEGT et al., 2011
	68	Água superficial	Itália	LOOS et al., 2010
E2	1330– 2270	Esgoto sanitário	Curitiba (PR)	FROEHNER, 2011
	490 – 760	Efluente de ETE		
	106 – 6800	Água superficial	Atibaia, Campinas, Paulínia e Americana (SP)	MONTAGNER, 2007
	9,2	Esgoto sanitário	Japão	HASHIMOTO et al., 2007
	0,34	Água superficial	Koréia	SHIN et al., 2011
EE2	5810	Esgoto sanitário	Atibaia, Campinas, Paulínia e Americana (SP)	GHISELLI, 2006
	5040	Efluente de ETE		
	1200 – 3500	Água superficial		
	600 – 1260	Esgoto sanitário	Curitiba (PR)	FROEHNER, 2011
	0,3 – 1,7	Efluente de ETE	Itália	BARONTI et al., 2000
	5 – 7	Esgoto sanitário	França	CARGOUET et al., 2004
	3 – 4,5	Efluente de ETE		
	1 – 3	Água superficial		
1,5	Efluente de ETE	Alemanha	PAWLOWSKI et al., 2004	

2.3. Fontes de exposição dos desreguladores endócrinos no meio ambiente

A alta produtividade dos mais variados bens de consumo, além de medicamentos, pesticidas, estrogênios e alimentos lançados no meio ambiente diariamente faz com que os organismos estejam em contato com desreguladores endócrinos. Esses podem ser associados a vários efeitos e possuem características diferentes de acordo com a classe pertencente, alguns podem ser lipofílicos, persistentes, bioacumulativos, possuir alta ou baixa pressão de vapor, se difundindo com maior ou menor facilidade no meio ambiente (BILA, 2005).

De acordo com Aquino et al., (2013) a exposição aos desreguladores endócrinos pode ocorrer de maneira direta, através de contato no trabalho ou casa ou indireta, através da ingestão de água e alimentos e pode possuir três origens:

- Origem humana: uso de medicamentos, excreção de hormônios naturais, produtos de limpeza e higiene pessoal;
- Origem na agropecuária: excreção de hormônios naturais, aplicação de promotores de crescimento nos animais, uso de pesticidas, reuso de lodo de ETE na agricultura;
- Origem industrial: indústria farmacêutica, produção de plástico, entre outras.

Uma das maiores exposições da população aos desreguladores endócrinos é através da ingestão de alimentos contaminados. No caso dos seres humanos estima-se que mais de 90% dos tóxicos ambientais são absorvidos por via digestiva (REYS, 2001). O BPA é utilizado no revestimento de algumas latas de alimentos, sendo um exemplo de DE encontrado em alimentos humanos devido a sua migração das embalagens para o próprio alimento (BILES *et al.*, 1997, KUO e DING, 2004). Além disso, alguns DEs são lipofílicos, logo podem ser encontrados em peixes, carnes, ovos e derivados de leite. Hartmann *et al.* (1998) relataram a ocorrência de hormônios sexuais (E2, E1, testosterona e progesterona) em carnes, leite e seus derivados, ovos e plantas. Outra explicação para a contaminação de alimentos é pelo fato de que alguns hormônios são aplicados na criação de animais que são consumidos na alimentação humana. Outra fonte de contaminação é a exposição dos alimentos tais como frutas e verduras a pesticidas que em baixas concentrações podem contaminar a água potável (BIRKETT e LESTER, 2003).

Um importante fator a ser considerado na exposição de uma substância química é a relação dose, potência e polaridade (K_{ow}). Dose é a quantidade de uma substância que será recebida em um meio ou por algum organismo, enquanto potência é a capacidade que uma

substância possui de causar resposta no meio ou organismo, seja essa benigna ou não. Apesar de distintos, esses conceitos estão diretamente relacionados entre si. Uma baixa dose de uma substância potente pode causar o mesmo efeito que uma alta dose de uma substância com baixa toxicidade (ACSH, 1999). Outro fator a ser considerado é a capacidade de bioacumulação de determinados DEs. A exposição a baixos níveis de substâncias que bioacumulam com o tempo podem levar a altos níveis nos organismos, principalmente para substâncias apolares. Por isso, quanto maior o nível trófico ocupado na cadeia alimentar maior a concentração de determinadas substâncias nos organismos (HARTMANN *et al.*, 1998).

2.4. Efeitos deletérios em organismos devido a exposição a desreguladores endócrinos

Estudos sobre os efeitos dos DEs surgiram devido a eventos relacionados ao contato de humanos ou animais com esses compostos. Em 1995 foi observado anomalias no sistema reprodutivo de jacarés devido a sua contaminação com o pesticida DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano) após esse ser despejado no Lago Apopka na Flórida (GUILLETE *et. al.*, 1996). Ainda na década de 1990, Carlsen *et al.* (1992) desenvolveu um estudo na Dinamarca onde se observou o declínio na qualidade do sêmen de homens supostamente devido a exposição progressiva a estrogênios.

Atualmente existe uma vasta literatura sobre os danos causados pelos DEs, tais como, disfunção da tireoide em aves e peixes, diminuição da fertilidade em aves, peixes, crustáceos e mamíferos, deformidades de nascimento em aves, peixe e tartarugas, feminização de peixes, aves e mamíferos machos, anormalidades comportamentais em aves, vulnerabilidade no sistema imunológico de aves e mamíferos, indução ao hermafroditismo, alteração no funcionamento de glândulas dos animais e diminuição da sobrevivência da prole (SANTAMARTA, 2001; USEPA, 1997; RODGER *et al.*, 2001).

O DEs BPA, E2 e EE2 são responsáveis pela desregulação endócrina em diversos animais como podem demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Efeitos dos DEs BPA, E2 e EE2 em animais silvestres

Desregulador endócrino	Espécie	Efeito	Referência
BPA	Peixe	Declínio da reprodução	SHIODA e WAKABAYASHI, 2000
		Diminuição da qualidade do esperma e indução da síntese de vitelogenina	HATEF et al., 2012
		Indução de malformações de otólitos	GILBERT et al., 2011
	Mamífero	Anomalia no sistema reprodutivo de ratos	MARKEY et al., 2003
		Câncer de próstata e esperma diminuído em homens, Síndrome do ovário policístico, aumento da liberação de prolactina em mulheres	TESKE e ARNOLD, 2008
	Mexilhão	Alteração funcional da glândula digestiva	CANESI et al., 2008
E2	Peixes	Feminização de peixes	RODGER et al., 2001; KNORR e BRAUNBECK, 2002
		Alteração nas gônadas	PANTER et al., 2000
		Hermafroditismo	HARTLEY et al., 1998
		Incidência de testículo-óvulos nas gônadas	KANG et al., 2002
		Declínio na reprodução	SHIODA e WAKABAYASHI., 2000
	Tartaruga	Inibição do crescimento testicular	PANTER et al., 1998
		Mortalidade elevada dos descendentes	KNORR e BRAUNBECK, 2002
	Mexilhão	Indução a síntese de VTG	PANTER et al., 2000, MONCAUT et al., 2003, ROUTLEDGE <i>et al.</i> , 1998, ROSE et al., 2002
		Indução a síntese de VTG no sangue e alterações na produção de ovos	IRWIN et al., 2001
		Indução da síntese de vitelogenina em machos	CIOCAN et al., 2010
EE2	Peixes	Alteração funcional da glândula digestiva	CANESI et al., 2008
		Indução a síntese de VTG	SCHIMID et al., 2002, ROSE et al., 2002, FOLMAR et al., 2000; DESBROW et al., 1998
		Mortalidade da espécie	SCHMID et al., 2002
	Mamífero	Declínio na reprodução	ROBINSON et al., 2002
		Câncer de próstata em homens	TESKE e ARNOLD, 2008
	Mexilhão	Indução da síntese de vitelogenina em machos	CIOCAN et al., 2010
	Alteração funcional da glândula digestiva	CANESI et al., 2008	

Nos humanos, os hormônios são responsáveis por diversas funções bioquímicas e fisiológicas e existem evidências que sua influência pode estar relacionada com patologias, como o câncer de mama, testículo, próstata, disfunção na tireoide e alterações no sistema reprodutivo, como diminuição na produção de espermatozoides e deformação dos órgãos reprodutores (KOIFMAN e PAUMGARTTEN, 2002). De acordo com Damstra et al. (2002), vários grupos de pesquisas relacionam a quantidade de sêmen da população masculina com a presença de esteróides na água.

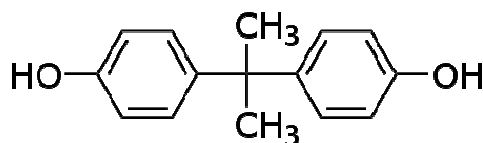
No caso da população feminina a presença de hormônios na água pode causar anomalias tais como irregularidade do ciclo menstrual, prejuízos na fertilidade e ovários policísticos. Estudos sobre o composto Dietilestilbestrol (DES), medicamento usado por mulheres entre os anos 50 e 70 para evitar abortos e promover o crescimento fetal, indicaram um péssimo resultado, pois promoveu câncer de vagina e infertilidade nas filhas nascidas de mães que usaram esse medicamento (BOWLER e CONE, 2001; COLBORN et al., 2002).

A quantidade, assim como a fase da vida em que se expõe um organismo a um DE tem enorme relevância. Uma fase de exposição muito delicada é a fase gestacional onde os DEs presentes no corpo da fêmea podem ser transferidos para seus embriões, fetos ou filhotes através dos ovos, placenta ou leite materno afetando assim o desenvolvimento fetal e em alguns casos podem vencer a barreira hematoencefálica e provocar danos ao sistema nervoso. No caso dos animais aquáticos a chance de exposição é muito maior pois boa parte do ciclo reprodutivo ocorre fora do corpo da fêmea (REYS, 2001).

2.5. Bisfenol A

O bisfenol A (BPA), possui a estrutura química ilustrada na Figura 3, é um monômero que foi sintetizado a primeira vez pelo químico Alexander P. Dianin, em 1891 por meio de uma condensação de duas moléculas de fenol e uma molécula de acetona em presença de um catalisador em pH baixo e alta temperatura (RUBIN, 2011; STAPLES et al., 1998). As propriedades físico-químicas do BPA são apresentadas na Tabela 4.

Ensaio agudos *in vivo* em camundongos demonstraram que o BPA possui baixa atividade estrogênica, na faixa de 1000-15000 vezes menos potente do que o E2 ou E3, ou seja, há a competição para se ligar aos receptores de estrogênio, porém a afinidade é 1000 vezes mais baixa do que a do E2 (MILLIGAN e BALASUBRAMANIA, 1998).

Figura 3: Estrutura química do BPA**Tabela 4:** Propriedades físico – químicas do BPA

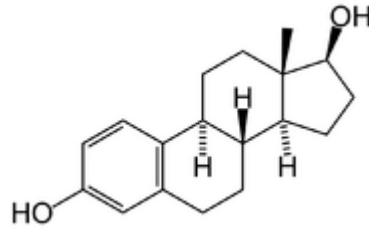
Peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	228
Solubilidade em água ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 20°C)	120 - 300
Fórmula molecular	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$
Log K_{ow}	3,32

O BPA é muito utilizado nos processos industriais, com sua principal aplicação como monômero na produção de policarbonato (71%) e resinas-epóxi (27 %), além de retardantes de chama, adesivos, papéis para fax, tubulações, painéis de carros e produtos eletrônicos, revestimentos de latas de conservas, revestimento interno nas latas de alumínio usadas em bebidas, frascos de alimentos para bebês e alguns polímeros usados no tratamento dentário. Estima-se que em 2005 a produção alcançou 3.500 milhões de toneladas do produto (BILES *et al.*, 1997, FROMME *et al.*, 2002; BKH, 2005).

Países como a Austrália e Estados Unidos possuem legislações que controlam a presença do BPA nas águas, tanto as destinadas ao consumo humano quanto em efluentes de tratamento secundário (NRMCC, 2008; WHO, 2011; NRMCC, 2015; BUI *et al.*, 2016). No Brasil, a Anvisa (2006) apenas proibiu o uso de BPA em mamadeiras utilizadas por lactentes e para descarte nos corpos hídricos, presença na água para consumo humano e em alimentos, não existe nenhuma legislação vigente.

2.6. 17β – Estradiol

O 17β -estradiol (E2), cuja estrutura química está ilustrada na Figura 4, é um estrogênio natural que pode ser utilizado em anticoncepcionais e em casos de reposição hormonal. Estimula a proliferação e crescimento nos órgãos do trato reprodutivo, ativa o desenvolvimento do endométrio do útero e influencia na libido (LINTELMANN *et al.* 2003; IKEHATA *et al.*, 2006).

Figura 4: Estrutura química do E2

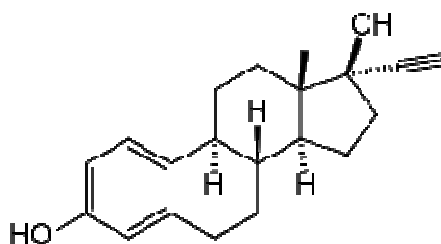
Sabe-se também que devido a dinâmica e velocidade das reações que ocorrem nos organismos dos seres vivos, o E2 é oxidado a E1, que em alguns casos pode ainda ser convertida em E3, sendo esse seu principal produto de excreção (GUEDES-ALONSO et al., 2013; STUMPE e MARSCHNER, 2009; YING; KOOKANA; RU, 2002). A Tabela 5 mostra algumas propriedades físico – químicas do E2.

Tabela 5: Propriedades físico- químicas do E2

Peso molecular (g.mol^{-1})	272,39
Solubilidade em água (mg.L^{-1} a 20°C)	13
Fórmula molecular	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$
Log K_{ow}	3,94

2.7. 17α – Etinilestradiol

O 17α -etinilestradiol, cuja estrutura é apresentada pela Figura 5, é um derivado do hormônio natural 17β -estradiol e foi desenvolvido a partir da adição de um radical etinil ao carbono 17 da molécula do E2. Embora os estrogênios possuam estruturas químicas semelhantes, o EE2 é mais resistente a biodegradação em relação ao composto original, e apresenta maior potencial estrogênico. Estudos mostram que a resposta estrogênica do EE2 em comparação a resposta do E2 e E1 pode ser até duas vezes mais elevada em seres humanos. (COMBALBERT e HERNANDEZ-RAQUET, 2010; ARIS et al., 2014; LIMA et al., 2012).

Figura 5: Estrutura molecular EE2

O EE2 está presente na maior parte nas formulações de pílulas anticoncepcionais, com dosagens que variam entre 15 a 50 μg por comprimido (DUONG et al., 2010). Também é utilizado em reposições hormonais, agricultura para promover o processo de crescimento de aves e gados, e na aquicultura para promover mudança de sexo e aceleração no crescimento de peixes (KÖRNER et al., 2008; NOPPE et al., 2008). A Tabela 6 mostra algumas propriedades físico – químicas do EE2.

Tabela 6: Propriedades físico-químicas do EE2

Peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	296,40
Solubilidade em água ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 20°C)	4,8
Fórmula molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$
Log K_{ow}	4,15

Assim como o BPA, os hormônios mesmo sendo encontrados nos corpos hídricos em baixas concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), são suficientes para causarem algum efeito biológico, como a indução da síntese de *vitelogenina* em peixes, devido ao alto potencial estrogênicos dessas substâncias (CÉDAT et al., 2016).

2.8. Métodos analíticos para determinação de desreguladores endócrinos em matrizes ambientais

A complexidade das matrizes ambientais, tais como águas naturais, ar, sedimentos, solo, lixiviados, efluentes industriais e domésticos que apresentam uma variedade de substâncias e se encontram na maioria das vezes em baixas concentrações, como na ordem de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ impõe algumas dificuldades na identificação e quantificação desses compostos, necessitando o desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos sensíveis e específicos para sua determinação.

Atualmente existem muitas técnicas analíticas para determinar esses compostos e a maioria empregam técnicas cromatográficas para promover a separação dos analitos de interesse (PESSOA, 2012; ARAUJO 2014).

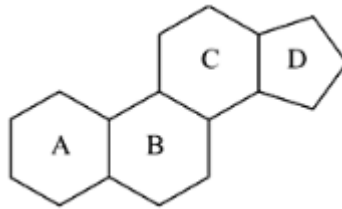
A ausência de metodologias padronizadas para o desenvolvimento analítico possibilita que a escolha seja feita de acordo com a estrutura do laboratório (PESSOA, 2012), avaliando sempre fatores como disponibilidade, capacidade técnica, tempo de análise, custo, precisão, faixa de aplicação e adaptabilidade, entre outros (GHISELLI, 2006). Devido às baixas concentrações em que os compostos se encontram são necessários cuidados específicos e eliminação de interferentes, tais como limpeza dos materiais utilizados na coleta com água ultrapura e solventes orgânicos, cuidado no transporte e estocagem, armazenamento a temperaturas de 4^oC. Após a coleta normalmente são aplicadas técnicas filtração para remoção de sólidos, ajuste do pH em alguns casos, extração e concentração dos analitos (YING, 2007).

2.9. Atividade estrogênica

Os desreguladores endócrinos possuem diversos mecanismos que podem causar alterações no sistema endócrino. Uma delas é a atividade estrogênica, que consiste na capacidade de uma substância em se ligar a um receptor de estrogênio e produzir uma resposta, ou seja, é a capacidade de produção de respostas qualitativamente similares as respostas produzidas pelos estrogênios como o 17 β -estradiol, que diversas vezes é utilizado como padrão de comparação em ensaios *in vitro*. (BILA, 2005).

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), os hormônios esteroides possuem uma estrutura química básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si (A, B, C e D), estrutura conhecida como ciclo-pentano-peridro-fenantreno (Figura 6). O anel fenólico A é por onde ocorre a ligação aos receptores estrogênios (RAIMUNDO, 2007). Nos desreguladores endócrinos que possuem atividade estrogênica observa-se em comum o grupo fenólico, que é considerado fundamental para a alta afinidade de ligação da substância ao receptor de estrogênio, traduzindo-se na ocorrência de estrogenicidade (BIRKETT e LESTER, 2003; KIDD et al., 2012).

Figura 6: Estrutura química comum dos esteroides



Estudos indicam que, o efeito potencial de uma substância quando em contato com outra numa mesma solução é diferente do efeito de uma substância isolada. Sumpter e Jobling (1995) concluíram que a combinação de substâncias estrogênicas é consideravelmente mais potente do que cada substância estrogênica sozinha, ou seja, a atividade estrogênica do 17β -estradiol pode apresentar efeito aditivo quando avaliado juntamente com outro estrogênio.

2.10. Ensaios utilizados na avaliação da atividade estrogênica

Muitos ensaios são utilizados para determinar a atividade estrogênica em amostras ambientais, tanto ensaio *in vivo* quanto *in vitro*. Os ensaios *in vivo* costumam incluir a avaliação do comportamento, crescimento, desenvolvimento, morfologia, pesagem e histologia de órgãos reprodutivos, níveis de hormônios no sangue e síntese de proteínas, enquanto os ensaios *in vivo* avaliam a proliferação de células animais, síntese de hormônios e enzimas esteroides, ligação nos receptores de estrogênio, análises bioquímicas e ensaios com gene recombinante (GRAY *et al.*, 1997).

Os ensaios *in vitro* têm algumas vantagens, tais como, não utilizam animais, sensibilidade a baixas concentrações, especificidade, são mais econômicos e rápidos, requerem pouca quantidade de amostra e podem ser aplicados para misturas complexas (águas naturais, lodos biológicos, etc) (BERESFORD *et al.*, 2000). No caso dos ensaios *in vivo* eles possuem vantagens tais como a possibilidade de explicações para os mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. São ensaios utilizados há décadas em testes toxicológicos e análise de riscos, abrangem larga faixa de mecanismos, fornecem a compreensão e avaliação do sistema endócrino (GRAY *et al.*, 1997, ZACHAREWSKI, 1997).

Dos ensaios *in vivo* destacam-se dois ensaios clássicos em roedores para a identificação de substâncias estrogênicas: o ensaio uterotrófico, que avalia a alteração do peso uterino e o

ensaio de cornificação da mucosa vaginal, em que o objetivo é detectar as mudanças histológicas nas células epiteliais da mucosa vaginal (BAKER, 2001). Ensaios com peixes também são frequentemente utilizados uma vez apresentam menor custo e complexidade (SOTO et al., 1995). Nos peixes a atividade estrogênica é medida pela capacidade dos compostos de induzirem a síntese do biomarcador vitelogenina (VTG) no plasma sanguíneo, a VTG é uma proteína que possui importantes funções no sistema reprodutivo, ela é sintetizada pelo fígado e transportada pelo sangue para os ovários. Está presente no organismo de fêmeas e machos, normalmente os níveis de VTG nos organismos dos machos é muito baixa e não detectada, entretanto quando os peixes machos são expostos a substâncias estrogênicas são capazes de produzir VTG, podendo essa ser utilizada como evidencia de exposição a substâncias com atividade estrogênica. Dessa forma, é muito útil na avaliação em ambiente aquáticos, por exemplo. (SCHMID et al., 2002; FOLMAR et al., 2000; JOHNSON et al., 2000; HANSEN et al., 1998; IRWIN *et al.*, 2001, PANTER *et al.*, 1998). Além de peixes, outros organismos são utilizados para avaliar a atividade estrogênica via indução da síntese da proteína VTG, tais como pássaros, anfíbios e répteis (OECD, 2002).

No caso dos ensaios *in vitro*, os mais utilizados englobam ensaios de interação com receptores hormonais, ensaios de proliferação de células e ensaios de gene repórter em células de mamíferos ou leveduras (BAKER, 2001). O ensaio E-screen avalia a estrogenicidade de uma amostra através do crescimento celular pela mitose das células cancerígenas MCF-17, quando em contato com substâncias estrogênicas (SOTO et al., 1995). Outros ensaios muito utilizados são os que usam a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes que possuem um receptor de estrogênio como via de sinalização, dentre eles o mais utilizado é o ensaio Yeast Estrogen Screen (YES) (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). Os ensaios *in vitro* determinam a atividade estrogênica total de uma amostra negligenciando quais compostos são responsáveis por essa atividade. A atividade estrogênica total na amostra é então comparada com a atividade do estrogênio endógeno 17β -estradiol, e pode ser expressa como equivalentes de estradiol (EQ-E₂) (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

2.10.1. Ensaio *in vitro* YES

No ensaio YES, a cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi modificada por técnicas de engenharia genética, onde é incorporada uma sequência de DNA do receptor

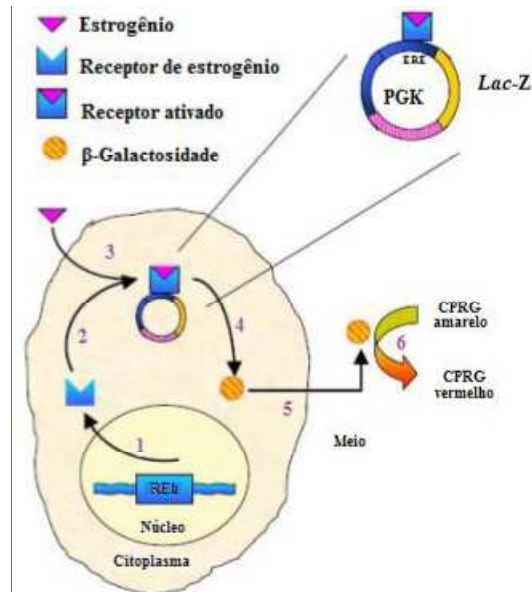
humano de estrogênio (REh) no cromossomo principal da levedura, que possui plasmídeos que carregam o gene repórter *lac-Z*, que em contato com substâncias estrogênicas liberam a enzima β – galactosidase. Esta quando secretada para o meio de análise provoca a metabolização do substrato clorofenol vermelho β -d-galactopiranosida (CPRG), que inicialmente possui coloração amarelada e muda para a coloração rosa (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; CÈDAT et al., 2016).

A Figura 7 representa o percurso do estrogênio desde sua entrada na célula da levedura até a indução da β -galactosidase, e consequente mudança da cor do meio. O mecanismo que ocorre entre o estrogênio e o receptor é o “chave-fechadura”, específico para expressar o gene repórter *lac-Z* (ROUTLEDGE et al., 1997).

O ensaio YES é capaz de detectar concentrações de 17β -estradiol na ordem de $0,02 \text{ ng.L}^{-1}$ (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). Os resultados podem ser visualizados a olho nu com a uma mudança de coloração do meio e a quantificação colorimétrica, sendo detectada por espectrofotometria. Os resultados obtidos no ensaio são comparados aos resultados do controle positivo de 17β -estradiol, sendo os resultados expressos em concentração de equivalente 17β -estradiol (EQ-E2) (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). Essa determinação é feita com base nos valores de CE_{50} , que é o valor que elucida 50% da resposta da curva dose-resposta do 17β -estradiol (CÈDAT et al., 2016).

Alguns fatores devem ser considerados na análise dos resultados, por exemplo a toxicidade da amostra, que pode afetar o crescimento da levedura durante o ensaio, fato que pode ser comum em amostras ambientais (FRISCHE, et al., 2009).

Figura 7: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante para o ensaio YES.



Legenda: (1) modificação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para uma forma capaz de acoplar-se aos elementos de respostas de estrogênios (ERE); (2) e (3) expressão do REh no plasmídeo e ligação do estrogênio ao receptor (4) expressão do gene receptor da *lac-Z* quando em contato com estrogênio produzindo a enzima β -galactosidase (5) e (6) a β -galactosidase é lançada no meio, metaboliza o substrato CPRG, alterando sua cor de amarelada para avermelhada.

Fonte: Adaptado de ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996

2.11. Ensaios toxicológicos

Os ensaios toxicológicos surgiram em grande escala na década de 60, considerada marco da preocupação do homem com a poluição gerada pelos processos tecnológicos. A Ecotoxicologia surgiu para complementar as análises físico-químicas que tradicionalmente são realizadas nos efluentes e corpos d'água (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

A toxicidade refere-se à capacidade de uma substância, produto ou conjunto de substâncias possuem de provocar efeitos danosos aos organismos quando estão em contato. Estes efeitos incluem alterações comportamentais, alteração de crescimento ou reprodução, até mesmo a morte dos organismos (AREZON et al., 2011). A Tabela 3, disponível no item 2.4, demonstra através da literatura que essas alterações podem atingir diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar.

Os efeitos a exposição de um organismo aos DEs variam de acordo com o período de vida. Estudos demonstraram que durante o período intrauterino, perinatal, juvenil ou puberdade, considerados períodos críticos pois os sistemas ainda estão em desenvolvimento

apresentam maiores riscos à saúde (FRYE et al., 2012). A Resolução CONAMA nº 430 (BRASIL, 2011), regula o lançamento de efluentes líquidos e exige que sejam realizados ensaios de toxicidade com pelo menos dois organismos de diferentes níveis tróficos.

Karci et al. (2014) avaliaram a toxicidade do organismo-teste *Vibrio fischeri* assim como a formação dos compostos intermediários durante a degradação do Nonilfenol pelo tratamento H_2O_2/UV e concluiu que mesmo com a geração de subprodutos como formaldeído, polietoxilato de alquilfenol entre outros compostos não identificados, a toxicidade foi alterada de 30 para 9% ao longo de 120 minutos de tratamento. Ensaios ecotoxicológicos realizados com organismo *Vibrio fischeri* demonstraram que 20 mg.L^{-1} de BPA causou inicialmente um efeito inibitório de 75%, entretanto após 120 minutos de oxidação com 2,5 mM de H_2O_2/UV esse resultado diminuiu para valores não tóxicos, ou seja, a eliminação do composto diminuiu a toxicidade aguda (HANCI et al, 2014). Cedat et al. (2016) também avaliaram com o organismo *Vibrio fischeri*, antes e ao longo do processo de degradação de $5\text{ }\mu\text{M}$ de E1, E2 e EE2 usando 50 mg.L^{-1} de H_2O_2/UV em água residual. A mistura antes do tratamento apresentou inibição de 35% e após o tratamento o efeito de inibição foi de 38%.

Outro ensaio de toxicidade aguda e subaguda foi realizado por Chen et al (2006) ao avaliar a toxicidade larval do peixe Japanese medaka (*Oryzias latipes*), para a concentração de $60\text{ }\mu\text{M}$ de BPA na presença de 50 mg.L^{-1} de H_2O_2/UVC , eles observaram uma diminuição da toxicidade aguda (após 72 horas) e subaguda (após 7 dias). A solução inicial mostrou 43% de toxicidade aguda e 58% de toxicidade subaguda com taxas de sobrevivência larval significativamente aumentada, indicando que o tratamento H_2O_2/UVC foi eficaz na redução da letalidade larval e sugere que os intermediários tóxicos não foram produzidos (CHEN et al, 2006).

2.12. Tratamentos para remoção de desreguladores endócrinos em matrizes aquosas

As estações de tratamento de águas residuárias constituem uma das principais fontes de contaminantes emergentes no meio ambiente, uma vez que recebem efluentes provenientes das fontes geradoras como residências, hospitais e indústrias (AQUINO et al., 2013). Diante disso, muitos estudos foram realizados para avaliar a remoção dos DEs em estações de tratamento de água e esgoto. Baronti et al (2000) demonstrou que um processo de lodos ativados de uma ETE na Itália removeu 95% de E3, 87% de E2, 85 % de EE2 e apenas 61% de E1. Enquanto Johnson e Sumpter (2001) relataram que o processo de lodos ativados

remove em torno de 85% do E2, E3 e EE2. Carballa et al (2004) ao investigarem a remoção de DEs nas ETE na Espanha, tais como o E2 e a E1 concluíram que no tratamento primário, o E2 foi parcialmente removido (20%). Em contrapartida, no tratamento biológico (processo de lodos ativados) o E2 foi removido 47%, alcançando uma remoção global na ETE em torno de 65%.

A remoção de DEs em estações de tratamento de esgoto é incompleta, uma vez que os tratamentos convencionais não são projetados para a remoção de tais compostos orgânicos (LEECH et al., 2009; LIU et al., 2009), o que pode causar sérios danos à saúde dos seres vivos, mesmo que os DEs se encontrem em baixas concentrações. Dessa forma, é necessária a utilização de tratamentos terciários tais como nanofiltração, osmose inversa, processos oxidativos avançados, ozonização e adsorção em carvão ativado (GEBHARDT e SCHRÖDER, 2007; JAMES et al., 2014; LÖWENBERG et al., 2014) para promover a remoção completa tanto da matéria orgânica e patógenos como de compostos orgânicos.

2.12.1. Processos oxidativos avançados

Os processos oxidativos avançados (POAs) baseiam-se na geração de radicais hidroxilas (HO^\bullet), espécie química altamente oxidante e não seletiva, que pode promover a degradação de compostos orgânicos mais rapidamente. A Tabela 7 mostra que o radical hidroxila possui o segundo maior potencial de oxidação dentre os oxidantes, perdendo apenas para o Flúor (HUANG et al., 1993). O sucesso desse processo se deve a altas constantes de reação entre os radicais HO^\bullet e muitos poluentes. Os radicais HO^\bullet podem modificar a estrutura química de compostos orgânicos recalcitrantes, os tornando mais simples, de menor massa molecular e mais biodegradáveis (GOGATE e PANDIT, 2004).

Tabela 7: Potencial de oxirredução de agentes oxidantes

Espécie química	E°V
Flúor	3,03
Radical Hidroxila	2,80
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio	2,07
Peroxido de hidrogênio	1,78
Permanganato de potássio	1,68

Ácido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36

Fonte: TEIXEIRA e JARDIM, 2004

Segundo Teixeira e Jardim (2004) os radicais hidroxilas gerados nos POAs são aplicáveis principalmente em efluentes com compostos biorefratários. O Quadro 1 mostra algumas vantagens e desvantagens desse tipo de tratamento.

Quadro 1: Aspectos positivos e negativos na utilização dos processos oxidativos avançados

Vantagens	Desvantagens
Combinação com outros processos para pré ou pós-tratamento, o que reduz o custo do tratamento	Em alguns processos utilizam longos tempos de reação
Versatilidade e eficiência, pois diversas classes de poluentes podem ser completamente mineralizadas, incluindo compostos refratários.	Podem gerar subprodutos indesejáveis ou tóxicos
Decomposição dos reagentes utilizados como oxidantes em produtos de menor impacto ao meio ambiente.	É necessária mão de obra qualificada
Os POA's podem ser aplicados no tratamento de contaminantes cuja concentração seja muito baixa (ppb, por exemplo)	Os custos podem ser elevados
Não apenas transferem os compostos de fase (como ocorre nas técnicas de membrana, entre outros) mas os modifica quimicamente	Na maioria dos casos, os POA's não geram resíduos, com exceção de alguns processos que podem envolver precipitação

Fonte: MORAIS, 2005; TEIXEIRA e JARDIM, 2004.

Existem diversos métodos de POA, todos em comum a geração do radical hidroxila, podendo ser classificados como (TEIXEIRA e JARDIM, 2004):

- Homogêneos: ocorre quando o substrato e o agente oxidante formam somente uma fase.
- Heterogêneo: ocorre quando o sistema é formado por mais de uma fase entre substrato e o catalisador.

Os POAs podem ou não ser combinados com a radiação ultravioleta, alguns exemplos de tratamentos de acordo com essas classificações estão ilustrados no Quadro 2.

Quadro 2: Processos oxidativos avançados

Processos	Homogêneos	Heterogêneos
Fotoquímico	H ₂ O ₂ /UV Foto – fenton O ₃ /UV H ₂ O ₂ /O ₃ /UV Cl/UV	Fotocatálise Heterogênea (TiO ₂ /O ₂ /UV)
Não fotoquímico	O ₃ /H ₂ O ₂ Reativo de Fenton	O ₃ /catalisador

Fonte: HUANG et al. (1993)

2.12.2. Fotólise

Segundo Koller (1952) a luz ou qualquer outra radiação eletromagnética é caracterizada por um fluxo de fótons onde a quantidade de energia é representada pela Equação 1.

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

E: a quantidade de energia (J)

h: constante de Plank

c: velocidade da luz

λ : comprimento de onda (m)

A radiação ultravioleta é uma fração da emissão luminosa e pode ser dividida em quatro tipos: UVA (315 a 400 nm), UVB (280 a 315nm), UVC (200 a 280 nm) e UV- vácuo (40 a 200 nm). A fotólise é uma dissociação que ocorre quando a molécula do composto absorve um fóton, e a energia desse fóton supera a energia de ligação dessa molécula, causando dessa maneira a ruptura na ligação química dos compostos. É um processo que com a presença de um agente oxidante pode levar a mineralização completa de compostos (ARAÚJO, 2002; GALINDO *et al.*, 2001).

2.12.3. Fotodegradação H₂O₂/UV

É um POA classificado como homogêneo que combina o agente oxidante peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com radiação ultravioleta, principalmente dentro da faixa UVC. A radiação emitida por lâmpadas ultravioletas é capaz de fotolizar as moléculas de H₂O₂, levando em muitos casos a degradação parcial de compostos recalcitrantes em elementos mais biodegradáveis. Ademais, podem ser utilizados em baixos fluxos de água e com baixas concentrações de H₂O₂, garantido assim bom custo benefício em relação a outros processos de degradação de micropoluentes (CÉDAT *et al.*, 2016).

Segundo Crittenden et al. (1999), a fotólise do H_2O_2 é a clivagem da molécula devido a energia gerada pelos fótons ($h\nu$), produzindo dois radicais hidroxila, como mostrado na Equação 2.



Os principais fatores do meio reacional que influenciam o processo são: dosagem de H_2O_2 , intensidade da radiação ultravioleta, pH, tempo de exposição à radiação, estrutura do composto e as características do efluente (SLOKAR e LE MARECHAL, 1998).

A fotodegradação utilizando peróxido de hidrogênio possui como vantagem a não formação de Bromatos e desinfetantes, não havendo necessidade de tratamento de gases ou disposição de rejeitos. Entretanto, tem como desvantagens a turbidez das amostras que pode interferir na penetração de radiação UV e menor eficiência de geração estequiométrica de $\text{HO}\cdot$. (KOMMINENI et al., 2000).

A Tabela 8 apresenta alguns estudos utilizando o processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ na remoção de desreguladores endócrinos, onde pode ser visualizado diferentes matrizes aquosas e doses do agente oxidante, variando dessa maneira a taxa de remoção em cada tratamento avaliado.

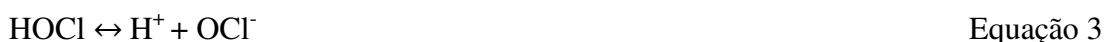
Tabela 8: Trabalhos relacionados ao estudo com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$

Compostos	Matriz	Condições	Remoção (%)	Referência
BPA	Água potável enriquecida com 20 mgL^{-1} BPA	$[\text{H}_2\text{O}_2] = 85 \text{ mg.L}^{-1}$; pH 6,5; 120 min	100	OLMEZ-HANCI et al., 2015
BPA	Água contendo NaCl, NaHCO_3 , ac. húmico e 50 mgL^{-1} de BPA	$[\text{H}_2\text{O}_2] = 50; 100; 200; 300; 400 \text{ mg.L}^{-1}$; 40 W	$[\text{H}_2\text{O}_2] 50 = 30;$ $[\text{H}_2\text{O}_2] 100 = 50;$ $[\text{H}_2\text{O}_2] 200 = 70;$ $[\text{H}_2\text{O}_2] 300 = 80;$ $[\text{H}_2\text{O}_2] 400 = 90$	SHARMA et al., 2015
E1, E2, EE2	Água potável com $1,3 \text{ mgL}^{-1}$ de E1 e E2 e $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ de EE2	$[\text{H}_2\text{O}_2] = 40 \text{ mg.L}^{-1}$; 55W, 1000 mJcm^{-2}	E1 = E2 = EE2 = 99	CÉDAT et al., 2016
E1, E2, EE2	Água deionizada com $50 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ de E1, E2 e de EE2	$[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mg.L}^{-1}$; 1050 mJ.cm^{-2}	E1 = E2 = EE2 = 100	MA et al., 2015
E1, E2, EE2	Água ultrapura com $50 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ de E1, E2 e de EE2	$[\text{H}_2\text{O}_2] = 15 \text{ mg.L}^{-1}$; 1050 mJcm^{-2}	E1 = 99,7; EE2 = 78; E2 = 76	MA et al., 2015
E2 e EE2	Água superficial	$[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ mg.L}^{-1}$; 350 mJ.cm^{-2}	90	ROSENFELD T et al., 2007

2.12.4. Fotodegradação Cl/UV

O cloro é um desinfetante comumente utilizado para controlar sabor, odor, cor e crescimento bacteriano em estações de tratamento de água. A radiação UV também é utilizada para desinfecção de água potável e residual (WATTS e LINDEN, 2007). A combinação desses dois tratamentos dá origem a um POA homogêneo relativamente novo, com a vantagem de acelerar o processo de degradação dos contaminantes (SICHEL et al., 2011). Apesar de possuir estudos recentes segundo Watts et al. (2007), esse processo pode ser mais eficiente do que processos consolidados segundo a literatura como POA utilizando peróxido de hidrogênio.

Nesse processo, os radicais HO[•] e Cl[•] são produzidos a partir da fotólise, através das reações representadas pelas Equações de 3 à 6 (FENG et al., 2007; WATTS e LINDEN, 2007; BOLTON, 2010).



Estudos tem demonstrado que o Cl/UV é eficaz na degradação de contaminantes persistentes, por exemplo, desetilatrizina, sulfametoxazol, carbamazepina, diclofenaco, benzotriazol, tolil-triazol, iopamidol, 17a-etinilestradiol (SICHEL et al., 2011), nitrobenzeno, *p*-ácido clorobenzoico, ácido ciclohexanóico e tricloroetileno (WANG e CHU, 2012).

Os subprodutos da desinfecção (DBPs) são sempre uma preocupação quando o cloro é usado. Entretanto, foi relatado que o processo de Cl/UV não gera quantidades significativas de trihalometanos (THMs) ou ácidos haloacéticos (HAAs) (ROSENFELDT et al., 2013; WANG et al., 2016; ZHAO et al., 2011). A literatura não reporta muitos trabalhos combinando cloro com radiação para degradação de estrogênios e bisfenol A. A Tabela 9 mostra alguns trabalhos envolvendo a fotodegradação Cl/UV para alguns compostos emergentes.

Tabela 9: Trabalhos relacionados ao estudo com Cl₂/UV

Compostos	Matriz	Condições	Remoção (%)	Referência
Atrazina	Água deionizada enriquecida com 1mM	[Cl ₂] = 50 µM	90%	KONG, X. et al., 2016.
EE2 Carbamazepina Diclofenac	Água da torneira enriquecida com 1mgL ⁻¹	[HOCl] = 1 mg.L ⁻¹	100% 100% 100%	SICHEL et. al, 2011
Ibuprofeno	Água deionizada enriquecida com 10 µM de IBP	[Cl ₂] = 100 µM	100%	XIANG, Y. et al., 2016
EE2 E1 E3	Água residual enriquecida com 1 µg.L ⁻¹ de EE2, E1 e E3	[ClO ₂] = 0,5 mg.L ⁻¹	35% 40% 40%	HEY, G. et al., 2012
Paroxetina Tramadol Risperidona	Água residual enriquecida com 1 µg.L ⁻¹ de cada fármaco	[ClO ₂] = 3,75 mg.L ⁻¹	100% 90% 70%	HEY, G. et al., 2012
Cafeína	Água potável enriquecida 39 ngL ⁻¹ de cafeína	[Cl ₂] = 3mg.L ⁻¹	20%	X. YANG et al., 2016

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Materiais

Para realização dos experimentos foram utilizados os reagentes apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Reagentes utilizados nos experimentos

Reagentes	Fórmula química	Marca	Concentração
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	Merk	30%
Hipoclorito de sódio	NaClO	Sigma	5%
Ácido clorídrico	HCl	Vetec	PA
Hidróxido de sódio	NaOH	Sigma	PA
Tiosulfato de sódio	Na ₂ S ₂ O ₃	Vetec	PA
Acetonitrila	CH ₃ CN	Tedia	PA
Metavanadato de amônio	NH ₄ VO ₃	Merk	PA
Bisfenol A (BPA)	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	Sigma	99%
17 β Estradiol (E2)	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	Sigma	99%
17 α Etinilestradiol (EE2)	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	Sigma	99%

Além disso, a água ultrapura utilizada no preparo das soluções foi proveniente do sistema Milli-Q da Millipore Corporation e o filtro de seringa de nylon pré limpo com diâmetro 13 mm e poro 0,22 μm da Analítica. Os reagentes utilizados no ensaio *in vitro* YES: L-leucina, L-histidina, adenina, L-arginina-HCl, L-metionina, L-tirosina, L-isoleucina, L-lisina-HCl, L-fenilalanina, L-ácido glutâmico, L-valina, L-serina, tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, inositol, D-glucose, ácido aspártico, L-treonina, sulfato cúprico, sulfato de magnésio, pirofosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato férrico, hidróxido de potássio, biotina, CPRG (clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosida), todos de pureza ≥ 98%, foram obtidos da Sigma-Aldrich.

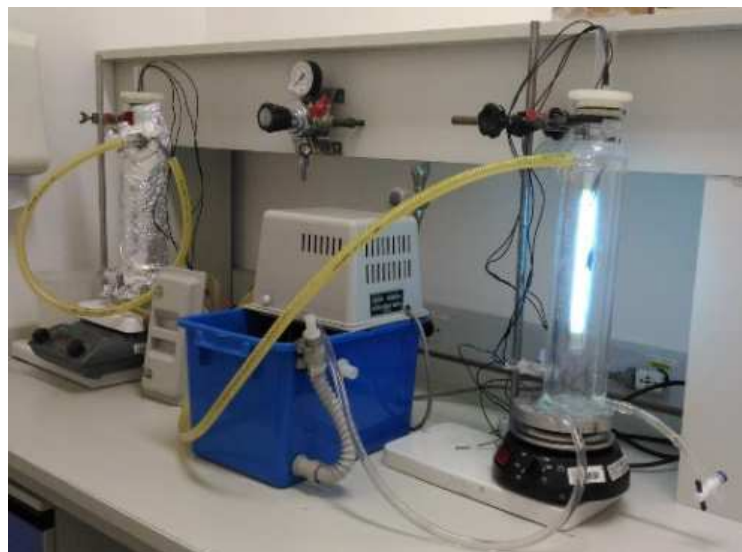
3.2. Solução Estoque

As soluções para os experimentos de fotodegradação foram preparadas em Acetonitrila, na concentração de 1 g.L^{-1} de cada um dos desreguladores endócrinos bisfenol A (BPA), 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2). A solubilização completa dos compostos ocorreu instantaneamente. A solução foi mantida refrigerada a aproximadamente 4°C para evitar a degradação dos compostos. Para realização dos experimentos a solução estoque contendo 1 g.L^{-1} de cada DE foi diluída na matriz aquosa de cada experimento (água Mili-Q, água da torneira ou água residual) para concentração final de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada um dos DEs.

3.3. Aparatos experimentais

O sistema reacional para fotólise (UV) e fotodegradação (Cl/UV e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$) nos procedimentos experimentais está apresentado na Figura 8. O sistema é composto por dois reatores com 500 mL de capacidade, cada um utilizando uma lâmpada UV, um sistema de recirculação de água que garante a manutenção da temperatura sempre em 25°C , não influenciando no processo de degradação, além de agitadores magnéticos. O sistema pode funcionar com um ou dois reatores simultaneamente.

Figura 8: Sistema reacional utilizado nos experimentos fotólise e fotodegradação Cl/UV e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$



Os experimentos foram realizados com irradiação UVA e UVC. Foram utilizadas lâmpadas que emitem radiação nos espectros UVA e UVC, ambas da marca Osram, com potência de 6 watts. Suas características são apresentadas na Tabela 11. A intensidade da radiação ultravioleta foi medida através do radiômetro Coler- Parmer series 9811.

Tabela 11: Especificações das lâmpadas UV

Lâmpada	Comprimento de onda máximo (nm)	Radiação mensurada (mW/cm²)
UVA	356	6,80
UVC	254	14,79

3.4. Configuração dos processos oxidativos avançados

Os experimentos de fotodegradação dos DEs pelos POAs foram realizados utilizando três diferentes matrizes aquosas: água ultrapura (ultrapure water), água da torneira (tap water), e água residual (wastewater), esta última proveniente do decantador secundário pós tratamento biológico, da estação de tratamento de esgoto da Fiocruz, localizada no Rio de Janeiro, cujo tratamento do esgoto é baseado em um sistema de lodo ativado com vazão de $512 \text{ m}^3 \cdot \text{dia}^{-1}$, tempo de retenção do lodo entre 18-30 dias e tempo de retenção hidráulica de 16-24 h. A água residual foi caracterizada através dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, como podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12: Parâmetros Físico-químicos e microbiológicos utilizados na caracterização da água residual

	Parâmetro	Unidade	Método
Análises físico - químicas	Carbono orgânico total (COT)	mg.L ⁻¹	5310 B
	Nitrato e nitrito	mg.L ⁻¹	4110 B
	Fosfato	mg.L ⁻¹	4110 B
	Cloreto	mg.L ⁻¹	4110 B
	Sulfato	mg.L ⁻¹	4500 C
Análises microbiológicas	Coliformes totais	nmp*	Colilert®
	<i>Escherichia coli</i>	nmp	Colilert®

*número mais provável

Todas as análises (Tabela 12) referentes aos parâmetros físico-químicos foram realizadas seguindo as metodologias descritas em (APHA, 2012) de acordo com os métodos específicos para cada parâmetro. Para as determinações microbiológicas, a quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* antes, durante e depois dos tratamentos Cl/UV e H₂O₂/UV, foi empregado o método Colilert seguindo os procedimentos descritos em USEPA (1978).

3.4.1. Fotólise

A partir da concentração inicial de 100 µg.L⁻¹ de cada DE em água ultrapura, as amostras foram expostas somente a radiação ultravioleta UVA e UVC com objetivo de avaliar o percentual de degradação. As amostras não sofreram correção de pH, sendo seu valor igual a 5. Os experimentos foram realizados por 120 minutos, com retiradas de alíquotas a cada 20 minutos.

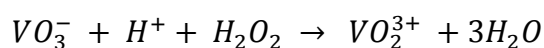
3.4.2. Fotodegradação H₂O₂/UV

Nesta etapa foram realizados testes preliminares a fim de se obter concentrações adequadas de peróxido de hidrogênio para os testes posteriores. Nos testes preliminares foram testadas concentrações de 1, 3, 5, 15, 30, 50, 75 e 100 mg.L⁻¹ peróxido de hidrogênio.

Para o processo de H₂O₂/UV, os experimentos foram realizados em duas matrizes aquosas (ultrapura e residual), como representado na Figura 9. Na água ultrapura foram testados dois diferentes tipos de fontes luminosas: UVA e UVC, além do teste branco, ou seja, em ausência de radiação. Para cada fonte luminosa foram analisadas duas concentrações, 3 e 30 mg.L⁻¹ de H₂O₂ e três valores de pH (5, 7, 9) para cada concentração. Nos experimentos com água residual foi testado apenas a radiação UVC e 3 mg.L⁻¹ de H₂O₂. Para essa matriz foram testados três valores de pH (5, 7, 9). A duração da reação foi distinta para cada análise, variando entre 20 e 120 minutos. Alíquotas foram retiradas a cada 2 minutos para reações em água ultrapura e a cada 5 minutos para experimentos utilizando água residual, para posteriores análises cromatográficas.

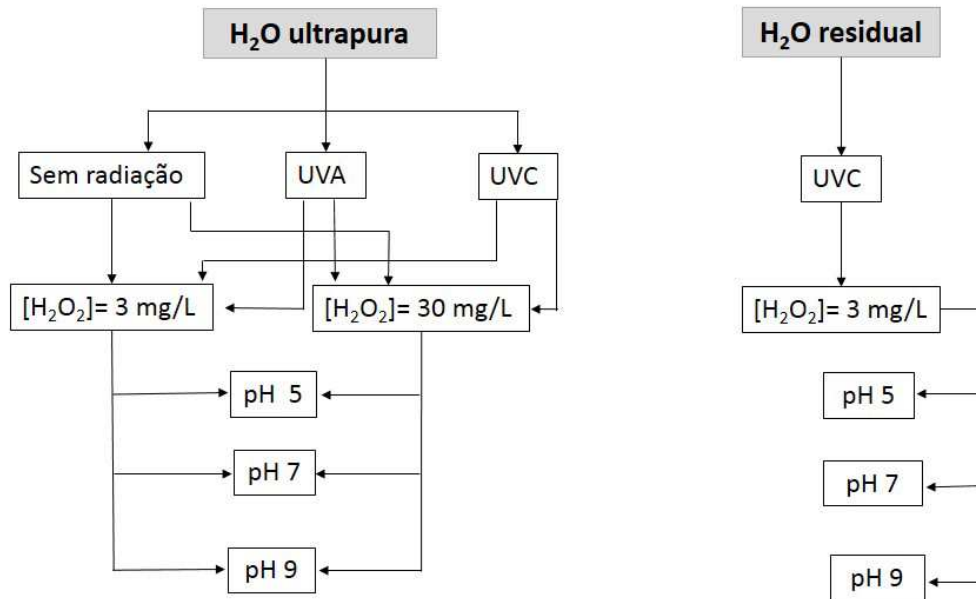
O monitoramento do pH inicial e final das soluções foi utilizado o equipamento pH MB 10 da Marte e o valor de pH das soluções foi ajustado utilizando HCl (0,01 N) para acidificar a amostra e NaOH (0,1 N) para alcalinizar a amostra.

Para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras foi empregado o método do metavanadato de amônio (NOGUEIRA; OLIVEIRA; PATERLINI, 2005) com leitura em 457 nm, na faixa de concentração entre 2 e 100 mg.L⁻¹ de H₂O₂. Este método consiste na reação entre o íon metavanadato, que possui coloração amarelada e o peróxido de hidrogênio em meio ácido, leva a formação do cátion peroxivanádio, que altera a coloração da amostra para avermelhada, como pode ser observado na Equação 7.



Equação 7

Figura 9: Esquema experimental para fotodegradação H₂O₂/UV



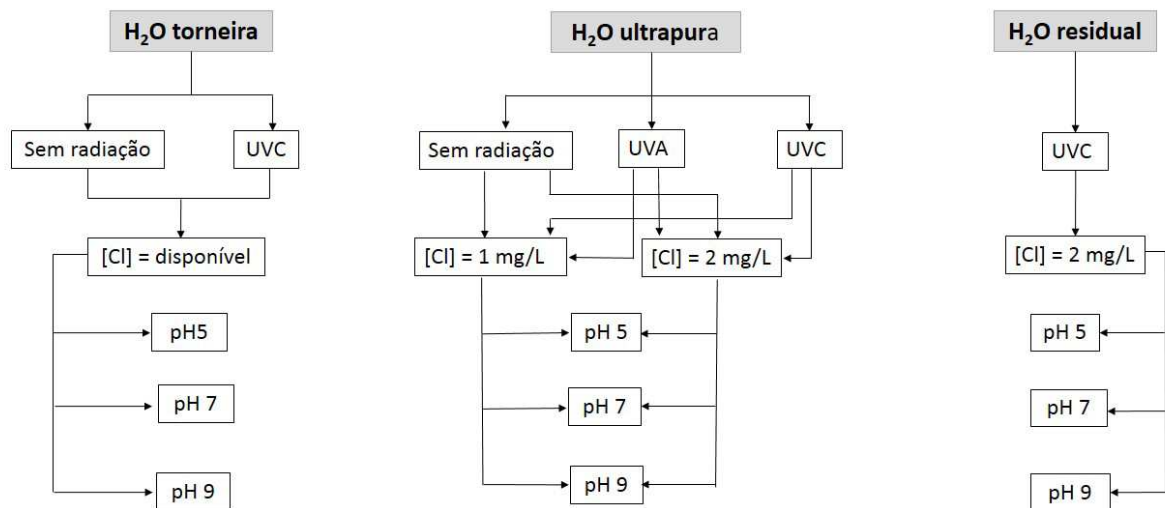
3.4.3. Fotodegradação Cloro/UV

Após testes preliminares, onde foram avaliadas as concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2; 5, 10, 12, 15 e 20 mg.L⁻¹ de cloro, obtidas através do reagente Hipoclorito de sódio 5%, foi adotado para esse estudo as concentrações 1 e 2 mg.L⁻¹ de cloro. A Figura 10 apresenta um esquema com as matrizes aquosas e as condições experimentais para a fotodegradação Cl/UV. Nos experimentos realizados em água ultrapura as condições foram: ausência de radiação, radiação UVA e UVC. Para cada condição foram testadas duas concentrações de cloro, 1 e 2 mg.L⁻¹ e por fim, para cada concentração de cloro foi avaliado três valores de pH (5, 7 e 9). Os experimentos utilizando água residual foram realizados sob a melhores condições estudadas, ou seja, utilizando radiação UVC e 2 mg.L⁻¹ de cloro, entretanto para o pH foram testados os três valores. Por fim, os testes realizados em água de torneira utilizaram somente o cloro disponível na própria água, não sendo assim adicionado hipoclorito de sódio a solução. Para esse experimento foi adotada a radiação UVC e ausência de luz, além da avaliação dos três valores de pH (5, 7 e 9). Quando foi necessário ajustar os diferentes pH das soluções, foi utilizado HCl (0,01 N) para acidificar a amostra e NaOH (0,1 N) para alcalinizar a amostra.

De acordo com a matriz aquosa, o tempo de reação variou entre 5 e 90 minutos. Foram

retiradas alíquotas a cada 30 segundos no caso da água ultrapura e água da torneira, enquanto para água residual as alíquotas foram retiradas a cada 5 minutos. Essas alíquotas tiveram o objetivo de avaliar a degradação de cada composto ao longo da reação. Ao fim do processo foi acrescentado tiosulfato de sódio em todas as amostras para interromper a reação, posteriormente foram filtradas e acondicionadas em vials para realização das análises cromatográficas. Para monitorar o cloro total e residual presente nas amostras durante o processo, foi utilizado o kit Pocket Colorimeter II (Hach). O monitoramento do pH inicial e final das soluções foi utilizado o equipamento pH MB 10 da Marte.

Figura 10: Esquema experimental para fotodegradação Cloro/UV



3.5. Método cromatográfico para CLAE/FLU

A quantificação dos desreguladores endócrinos BPA, E2 e EE2 foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/FLU), da marca Agilent Technologies 1200 series. Foi utilizado uma coluna C18, Zorbax Eclipse plus (5 μ m, 4,6x250 mm) Agilent Technologies. Foram injetados padrões de BPA, E2 e EE2 para obter o tempo de retenção e avaliação da sensibilidade do detector. Os parâmetros cromatográficos fluxo, volume de injeção, tempo de retenção, pressão, temperatura e fase móvel foram ajustados de forma a melhorar as condições de análise. A seleção do comprimento de onda de emissão e excitação foi adotada com base na literatura assim como os solventes acetonitrila e água ultrapura acidificada com HCl (0,01 N) a pH 3. A Tabela 13 mostra as condições

operacionais adotadas. Antes das injeções todas as amostras foram filtradas com filtro de nylon com diâmetro 13 mm e poro 0,22 μm (Analítica).

Tabela 13: Condições cromatográficas utilizadas

Coluna	C18, Zorbax Eclipse plus, 5 μm , 4,6x250mm
Comprimento de onda de emissão	310 nm
Comprimento de onda de excitação	230 nm
Fluxo	1,2 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	100 μL
Pressão	100 bar
Temperatura	26°C
Tempo de corrida	9 minutos
Tempo de retenção de cada composto	BPA = 6,5 minutos E2 = 6,9 minutos EE2 = 8,6 minutos
Fase móvel (Acetonitrila: Água ultrapura pH 3)	50:50 (isocrático)

3.5.1. Construção da curva analítica

A partir da solução estoque, a curva analítica usada na CLAE/FLU foi preparada diluindo em água os compostos BPA, E2 e EE2 em nove concentrações, na faixa variando entre 0,1 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto. A construção da curva foi realizada pela injeção de padrões dos compostos na faixa mencionada por três vezes, sendo assim seu valor determinado em função da média dos valores obtidos da triplicata.

3.5.2 Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de quantificação e detecção foram determinados segundo Anvisa (2003), limite de detecção é a menor quantidade de uma substância presente numa amostra que pode ser detectada, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas, enquanto limite de quantificação é a menor quantidade de uma substância em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições

experimentais estabelecidas. Os cálculos foram adotados segundo método da Anvisa (2003). Dessa maneira, a estimativa do limite de detecção pode ser feita segundo a Equação 8 e a estimativa do limite de quantificação segundo a Equação 9.

$$LD = \frac{3 \times DP_A}{IC} \quad \text{Equação 8}$$

$$LQ = \frac{10 \times DP_A}{IC} \quad \text{Equação 9}$$

9

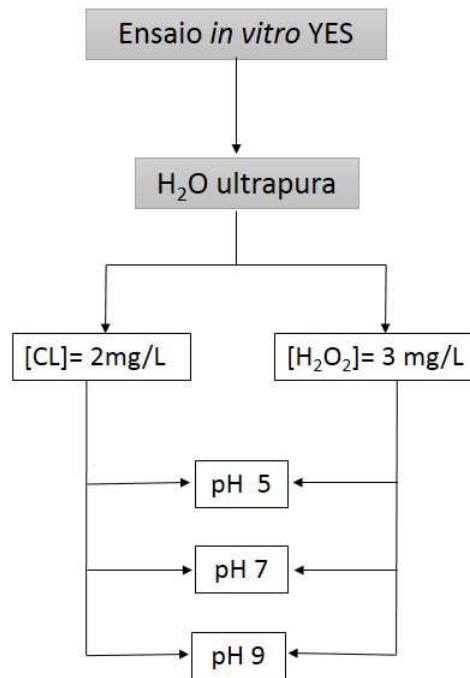
Onde, DP_A é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas e IC é a inclinação da curva de calibração. A Tabela 14 apresenta os limites de quantificação e detecção para cada composto obtido pelo método cromatográfico descrito no item 3.5.

Tabela 14: Limites de detecção e quantificação BPA, E2 e EE2

Desregulador endócrino	Limite de detecção ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
BPA	0,84	2,8
E2	0,22	0,72
EE2	0,26	0,88

3.6. Avaliação da atividade estrogênica por meio do ensaio *in vitro* YES

O ensaio *in vitro* YES (Yeast Estrogen Screen) desenvolvido segundo a metodologia de Routledge e Sumpter (1996), adaptado por Bila (2005) foi usado para avaliar a atividade estrogênica das amostras antes, durante e após os processos Cl/UV e H_2O_2/UV nos tempos determinados. Para esse ensaio foram analisadas treze amostras, dentre elas uma amostra contendo somente os padrões de BPA, E2 e EE2 na concentração $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto, considerada imediatamente antes dos tratamentos, as doze amostras restantes foram coletadas nas concentrações e valores de pH descritos na Figura 11. As amostras decorrentes do tratamento Cl/UV foram coletadas em 2 e 5 minutos de tratamento, enquanto as amostras provenientes do processo H_2O_2/UV foram coletadas em 5 e 20 minutos de tratamento.

Figura 11: Esquema experimental ensaio *in vivo* YES

3.6.1. Limpeza e descontaminação das vidrarias

A análise de substâncias em concentrações traço exige uma limpeza específica dos materiais utilizados nas análises, com o intuito de evitar contaminação por meio de interferentes. A metodologia específica de lavagem implementada no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) foi na vidraria e em todos os materiais utilizados durante o trabalho, com o objetivo de remover possíveis interferentes. O processo consistiu inicialmente na lavagem de vidrarias, com água da torneira, para depois serem deixados de molho em uma solução de detergente extran da Merk a 5 % por um período de 24h. Após o período de molho, os materiais foram enxaguados 10 vezes com água da torneira e em seguida com água ultrapura. Iniciou-se a limpeza com os solventes, primeiramente com acetona, seguida pela água ultrapura, etanol e finalização com água ultrapura. As vidrarias foram depositadas sobre bandejas forradas com papel alumínio para secagem em temperatura ambiente.

3.6.2. Preparação das soluções utilizadas no ensaio YES

As soluções foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas em temperatura ambiente, com exceção da solução de vitamina e de CPRG, que foi armazenada em geladeira. Após a esterilização as soluções somente foram abertas em capela de fluxo laminar. O preparo das soluções (Meio Mínimo, Glicose, Ácido L-aspártico, L-treonina, Sulfato de Cobre, Vitamina, CPRG e Meio de Cultivo) está disponível no ANEXO 1.

3.6.3. Cultivo da cepa da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) recombinante

O ensaio YES utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a cepa recombinante utilizada no presente trabalho foi obtida por doação da professora Marcia Dezotti do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. O preparo da cepa foi realizado sempre em capela com fluxo laminar segundo a metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações.

3.6.4. Procedimento do ensaio *in vitro* YES

O ensaio foi realizado em uma placa estéril de 96 poços em capela de fluxo laminar, de como ilustrado na Figura 12. O procedimento utiliza duas placas, sendo a primeira de diluição e a segunda de análise, onde será realizado o ensaio. Cada placa é dividida em 8 fileiras que são nomeadas de A até H, contendo 12 poços em cada fileira. Em um primeiro momento foi adicionado 10 μL de água ultrapura em todos os poços dos brancos (controle negativo) das placas de análise. Posteriormente, a etapa de diluição começou com a adição de 200 μL da amostra no primeiro poço da primeira fileira da placa de diluição. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta multicanal (12 canais), foram adicionados 100 μL de água ultrapura nos onze poços restantes da primeira fileira. A partir daí foi iniciada a diluição seriada da amostra na proporção 1:2, retirando-se 100 μL do primeiro para o segundo poço, 100 μL do segundo para o terceiro poço, assim sucessivamente até o décimo segundo poço que obteve volume final de 200 μL . A cada transferência de amostra entre os poços foi realizada uma homogeneização com o auxílio da própria pipeta.

Depois de diluídas, com uma pipeta multicanal o volume de 10 μL da amostra é transferido imediatamente para cada poço da fileira A e C da placa de análise, começando pelos poços da placa A, sendo as fileiras A e C correspondentes a mesma amostra, uma vez que o ensaio é feito sempre em duplicata. Posteriormente, deixou-se evaporar totalmente, dentro da capela de fluxo laminar, para dar prosseguimento ao ensaio. Na placa de análise é sempre utilizada uma fileira para amostra e uma fileira para o branco, intercaladamente, a fim de evitar contaminação.

Após a evaporação, foram adicionados na placa 200 μL do meio de análise, primeiramente nas fileiras dos brancos e posteriormente nas fileiras da amostra. O mesmo procedimento executado nas amostras é realizado para a análise do 17β -estradiol, utilizou-se uma solução estoque na concentração de $54,48 \mu\text{g.L}^{-1}$ preparada a partir do padrão 17β -estradiol em etanol, que é considerado o padrão dos ensaios de atividade estrogênica, sendo assim, é usado como controle positivo no ensaio YES para demonstrar a resposta estrogênica. Dessa maneira, as fileiras A e C correspondem a amostra em duplicata, enquanto a fileira E e G correspondem ao controle positivo e as fileiras B, D, F e H correspondem ao branco (controle negativo). A figura 12 mostra uma placa de análise após todo o procedimento.

Figura 12: Ilustração da placa de análise com amostra, branco e controle positivo (17β -estradiol)



As placas foram fechadas com fita adesiva e levadas ao agitador (Marca IKA, modelo MS-3), onde foram homogeneizadas por dois minutos e transferidas para a estufa, na qual permaneceram por 72 horas a 30°C . Ao final das 72 horas, já é possível observar a

mudança de coloração nos poços quando há atividade estrogênica, que passam de amarelo a tons de rosa. Quando retiradas da estufa, as placas foram levadas ao espectrofotômetro (Marca Softmax, modelo SpectraMax M3) e lidas nos comprimentos de onda de 575 nm para cor e 620 nm para turbidez). Foi plotada uma curva do perfil do controle positivo 17 β -estradiol ao longo dos cinco ensaios. Após a leitura, seguindo o protocolo de biossegurança, as placas e todo material que esteve em contato com a *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada foram autoclavados a 121°C por 15 minutos antes do descarte, a fim de inativar a levedura que esteve em contato com o material. Ainda que este OGM - organismo geneticamente modificado seja pertencente à classe de risco 1 (baixo risco individual e baixo risco para a comunidade - organismo que não causa doença ao homem ou animal), os protocolos para OGM são obrigatórios. Com base na curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol, o limite de detecção para cada ensaio pode ser calculado. A atividade estrogênica superior a 10% do valor do branco foi avaliada como positiva.

3.6.5. Análise dos resultados do Ensaio YES

Como descrito anteriormente as amostras são lidas nos comprimentos de onda 575 e 620 nm. Após as leituras das absorbâncias foi construído os gráficos com as curvas dose-resposta do ensaio. A absorbância de 620 mede a turbidez do poço devido ao crescimento da levedura, enquanto a absorbância de 575, que avalia a mudança de cor no ensaio e consequentemente indica atividade estrogênica. Dessa maneira, para corrigir a resposta estrogênica de cada poço de amostra ocasionada pela turbidez, prosseguiu-se com a aplicação da fórmula contida na Equação 10.

$$\mathbf{Abs}_{\text{corrigidaAmostra}} = \mathbf{Abs}_{575\text{Amostra}} - (\mathbf{Abs}_{620\text{Amostra}} - \mathbf{Abs}_{620\text{Branco}}) \quad \text{Equação 10}$$

A correção foi feita para cada poço da placa, utilizando os valores de absorbâncias obtidos nos dois comprimentos de onda para cada concentração na curva. Para calcular esta correção, utilizou-se a média dos valores das absorbâncias das duas fileiras de brancos correspondentes às amostras (fileiras B e D ou F e H), resultando na média de 24 amostras de branco. Assim, os dados apresentados correspondem à média das absorbâncias das amostras

analisadas em duplicata. As curvas dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol e da amostra foram construídas relacionando-se os valores da absorbância corrigida em função da concentração, em escala logarítmica. As curvas dos extratos das amostras foram expressas em percentual, sendo construídas da mesma forma que a curva dose-resposta do padrão 17 β -estradiol. O coeficiente CE₅₀ representa a concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão. Os valores de CE₅₀ do 17 β -estradiol foram determinados a partir de sua curva dose-resposta. Para as substâncias padrões também foi calculado o CE₅₀ a partir de sua curva padrão. Para o cálculo do CE₅₀ usou-se o programa Origin® 6.0.

3.7. Ensaio Ecotoxicológicos

Foram realizados ensaios ecotoxicológicos com dois organismos testes. Ensaio de toxicidade crônica com algas *Raphidocelis subcapitata* e o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, de acordo com a metodologia descritas na ABNT NBR 12648 (2018) e NBR 13373 (2017), respectivamente. Os experimentos Cl/UV foram realizados na concentração 2 mg.L⁻¹ de cloro, em água ultrapura, radiação UVC e pH 7, sendo as amostras analisadas em 2 e 5 minutos de tratamento, enquanto os experimentos H₂O₂/UV foram realizados com 3 mg L⁻¹ de H₂O₂, pH 9, também em água ultrapura e radiação UVC, e as amostras foram avaliadas após 5 e 20 minutos de tratamento. No tempo inicial, ou seja, imediatamente antes do tratamento (0 minutos), na concentração inicial de 100 μ g.L⁻¹ de BPA, E2 e EE2, sua toxicidade também foi avaliada.

3.7.1. Organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*

As amostras foram analisadas na concentração 100%, utilizando água de cultivo como controle negativo das amostras. Foi exposto um organismo por béquer, já com o alimento, sendo utilizado 10 réplicas para cada tempo analisado. Os frascos-testes foram mantidos entre 24 e 26°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuridão por no máximo oito dias. Os organismos foram alimentados diariamente e as soluções-teste foram renovadas no terceiro e quinto dia após o início do teste. A cada troca de solução, transferiu-se o

organismo para a nova solução com alimento, anotando o número de filhotes produzidos em cada réplica. O teste foi encerrado quando 60%, ou mais, das fêmeas adultas sobreviventes no controle tiverem produzido no mínimo 15 organismos jovens. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Tox stat.

3.7.2. Organismo-teste alga *Raphidocelis subcapitata*

As amostras foram analisadas na concentração de 100% com 5 réplicas para cada tempo analisado. O método de ensaio biológico consiste na exposição de uma suspensão de algas conhecidas, na ordem de 10^4 e 10^5 cel/mm³ na amostra por um período de 72 horas sob iluminação contínua e temperatura entre 23 e 27°C. O efeito tóxico é determinado pela comparação da reprodução ou inibição do crescimento da biomassa de algas nos recipientes com o controle, onde não é adicionado amostra, sob as mesmas condições de ensaio. Na contagem do número de células foi utilizada a câmera de Neubauer.

O fator de toxicidade foi determinado pela Equação 11.

$$IC = \frac{M_c - M_a}{M_c} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

onde,

IC é a porcentagem de inibição da multiplicação das células algáceas

M_a é a média de do número de células das soluções- teste

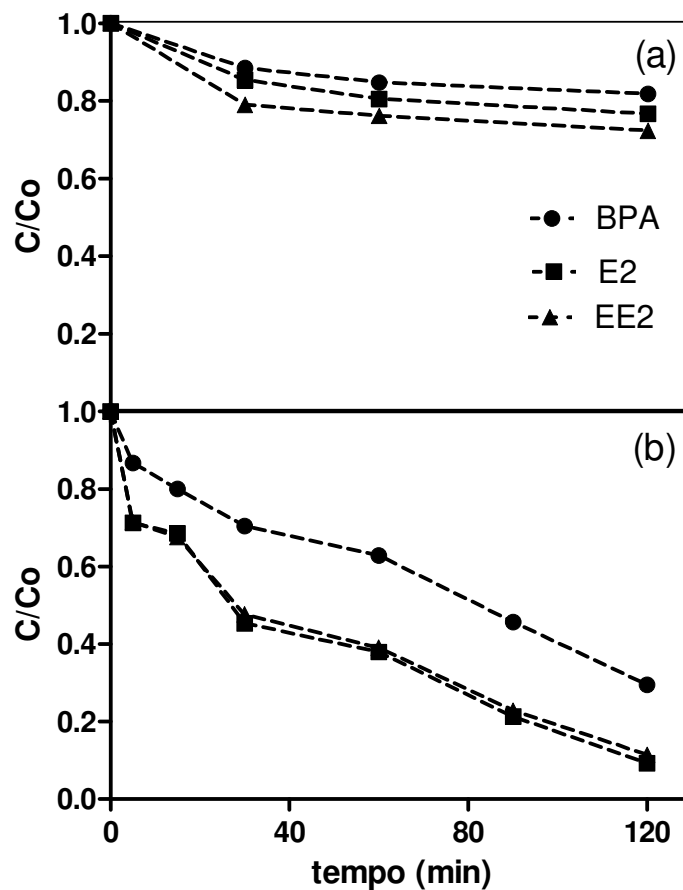
M_c é a média do número de células do controle

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Degradação dos desreguladores endócrinos por fotólise

A fotólise dos DEs foi realizada em pH 5, utilizando uma mistura de BPA, E2 e EE2 com a concentração inicial de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto. A Figura 13 apresenta os resultados para fotólise dos DEs sob radiação UVA e UVC.

Figura 13: Degradação dos DEs BPA, E2 e EE2 por fotólise em água ultrapura (a) UVA; (b) UVC; condições iniciais: $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada DE, $T=25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$.



Esses resultados mostraram que os processos apresentaram eficiências de remoção diferentes para cada composto, o BPA apresentou valores de degradação menores do que os estrogênios avaliados nos dois tratamentos, variando sua degradação entre 18 e 70% para

radiação UVA e UVC, respectivamente. Isso pode ser explicado pela estrutura do BPA, uma vez que quanto mais complexa a molécula e maior a presença de fenóis mais difícil se torna sua degradação pelo processo de fotólise (ZHOU e FANG, 1997). Todos os compostos apresentaram maiores taxas de degradação no tratamento utilizando radiação UVC em relação a radiação UVA. A máxima remoção dos compostos pelo processo fotólise foi de 89% dos compostos E2 e EE2 no tratamento com radiação UVC em 120 minutos, enquanto nas mesmas condições no tratamento UVA essa remoção foi de aproximadamente 28%.

Alves et al (2016) e Iseck (2015) observaram uma remoção do E2 de 88% e 75% respectivamente, com concentração inicial de tratamento 5 mg.L^{-1} para radiação UVC com tempo de tratamento de 120 minutos. Resultados similares foram obtidos por Liu et al. (2004), ao avaliarem a degradação do E2, com 60% de degradação quando exposto a radiação UVC, enquanto que a degradação sob radiação UVA foi negligenciável. Li Puma et al. (2010) demonstraram que sob radiação UVA, os compostos E2 e E22 foram 20 e 25% removidos após 180 minutos de tratamento, aumentando para 60% ao utilizar radiação UVC para ambos compostos. Neamtu e Frimmel (2006) ao realizarem experimentos em água ultrapura com BPA na concentração de 119 mg.L^{-1} , observaram remoção de 23% em 120 minutos de tratamento sob lâmpada UVC. Por outro lado, Kondrakov et al. (2014) observou 100% fotólise (UVC) de BPA em 130 minutos com concentração inicial de 50 mg.L^{-1} . Estudos realizados por Frontistis et al. (2015) concluíram que a degradação do EE2 segue a ordem UVC>UVA, a remoção do composto foi de 47 e 17% sob radiação UVC e UVA, respectivamente, após 60 minutos.

O processo fotólise direta ocorre baseada na absorção de fótons pela molécula do composto, dessa maneira o comprimento de onda de absorção máxima de cada composto e o comprimento de onda de cada lâmpada influenciam diretamente na taxa de degradação (GALINDO *et al.*, 2001). O BPA possui espectro de absorção UV mais intensa por volta de 230 nm (SANTOS, 2016), o E2 e EE2 apresentam uma fraca absorção na região de 290 a 350nm (COWDHURY et al., 2011). De Liz (2013) demonstrou que a maior absorção UV dos estrogênios E2 e EE2 ocorre na faixa 200-300 nm com picos de absorção em 230 e 280 nm, o que explica maiores taxas de degradação para radiação UVC (200-280 nm) em relação a radiação UVA (315- 400 nm), uma vez que absorção de fótons é muito mais forte nessa região para todos os compostos avaliados.

4.2. Degradação dos desreguladores endócrinos por H₂O₂/UV

4.2.1. Matriz água ultrapura

A degradação dos DEs BPA, E2 e EE2 por UV/H₂O₂ na concentração de 100 µg.L⁻¹ de cada composto em água ultrapura foi avaliada sob as condições de 3 e 30 mg.L⁻¹ de H₂O₂, na ausência de radiação, sob radiação UVA e UVC e diferentes pH (5, 7 e 9).

4.2.1.1. Ausência de radiação

Nos ensaios sem uso de radiação ultravioleta, 100 µg.L⁻¹ dos desreguladores endócrinos foram mantidos no escuro por 90 minutos após adição de 3 e 30 mg.L⁻¹ de H₂O₂ e ajustes de pH para valores iguais 5, 7 e 9. Em todos os casos tanto para a degradação dos compostos, assim como o consumo de H₂O₂ foi insignificante.

Chen et al. (2007) ao realizarem ensaios no escuro com BPA, E2, EE2 e nonilfenol (NP) com 10 mg.L⁻¹ de H₂O₂, concluíram que não houve degradação de nenhum dos compostos avaliados. Do mesmo modo, Chen et. al (2006) avaliaram que não houve remoção de 60µM de BPA com 50 mg.L⁻¹ de H₂O₂. Huang et al. (2010), concluíram que o BPA na presença de 2 mM de H₂O₂ em pH 8 não sofreu degradação relevante no experimento realizado no escuro.

A presença do agente oxidante H₂O₂ não é suficiente para que ocorra a degradação, uma vez que é necessária a radiação para que ocorra a ativação do H₂O₂, ou seja, ocorra sua fissão homolítica e consequente dissociação em radicais hidroxila, isso ocorre em comprimentos de onda curta, uma vez que a absorção de energia máxima do H₂O₂ ocorre em 254 nm (TEIXEIRA E JARDIM, 2004; LEAHY e SHREVE, 2000; SHEN e WANG, 2002).

4.2.1.2. H₂O₂/UVA

Os compostos foram avaliados utilizando a radiação UVA em nas concentrações 3 e 30 mg.L⁻¹ de H₂O₂ e nos pH 5, 7 e 9 por 120 minutos. A Figura 14 ilustra a fotodegradação do

BPA, E2 e EE2 em função do tempo na concentração de 3 mg.L^{-1} de H_2O_2 e a Figura 15 para a concentração de 30 mg.L^{-1} de H_2O_2 em diferentes pH.

Figura 14: Degradação de BPA, E2 e EE2 por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVA}$ em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3 \text{ mg.L}^{-1}$; $T = 25^\circ\text{C}$.

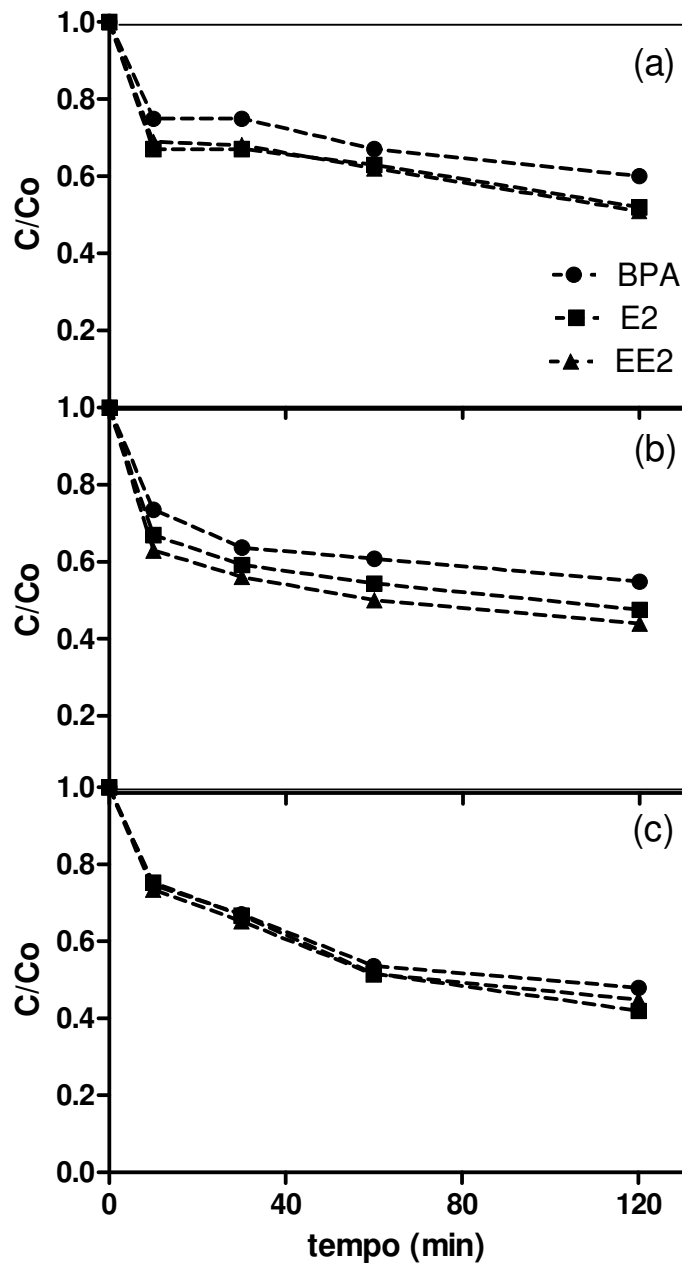
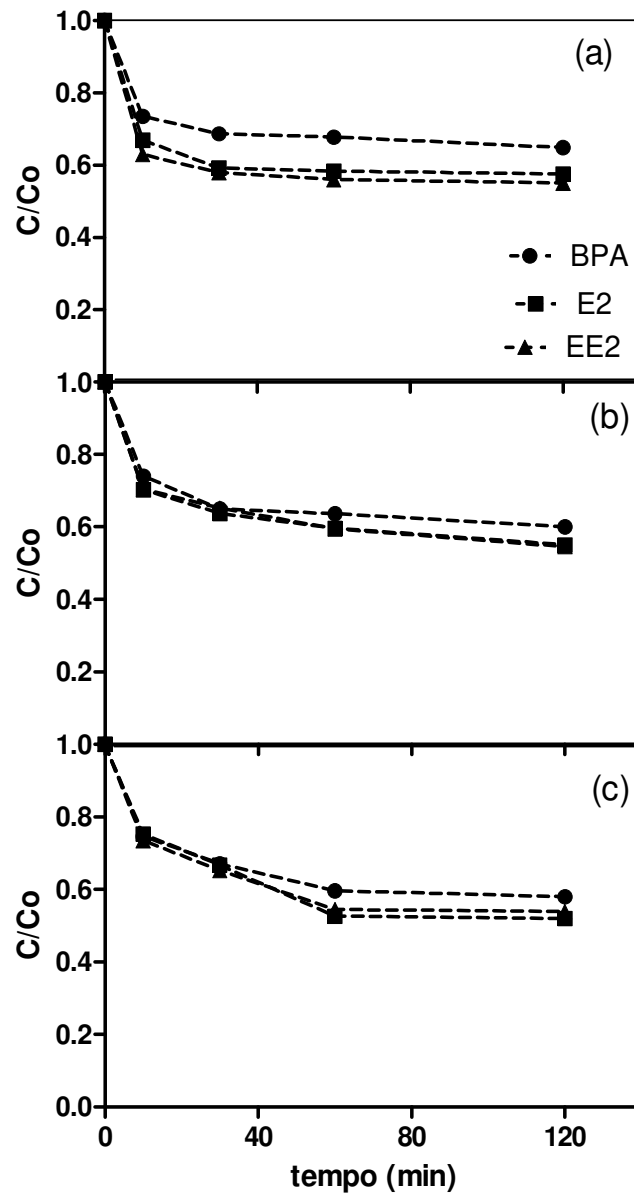


Figura 15: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H₂O₂/UVA em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: [H₂O₂] = 30mg.L⁻¹; T=25⁰C.



Assim como na fotólise, a degradação do BPA foi menor do que dos outros compostos. Em pH 5 e 3 mg.L⁻¹ após 120 minutos de tratamento, o BPA foi 40% removido, enquanto E2 e EE2 atingiram 47% de remoção (Figura 14(a)). Além disso, a remoção para as

duas concentrações de H_2O_2 apresentaram maior eficiência em pH 9. Esse valor de pH contraria a literatura para o caso de águas residuais, justificando que para valores alcalinos os íons bicarbonatos e carbonatos atuam como sequestrante de radicais hidroxila, como representado nas Equações 12 e 13 (EPA, 1998; MELO et al., 2009).



Comparando as concentrações de H_2O_2 utilizadas (3 e 30mg.L^{-1}), a máxima remoção dos compostos ocorreu na concentração 3mg.L^{-1} , demonstrando que o aumento da concentração de H_2O_2 não vem acompanhado do aumento da eficiência de remoção, uma vez que o excesso de H_2O_2 aumenta a concentração de radicais hidroxila, ocorrendo reações competitivas que produzem um efeito inibitório na degradação (DOMÈNECH et al., 2001).

A máxima remoção dos DEs ocorreu na concentração 3mg.L^{-1} em pH 9, alcançando 60% de remoção para os estrogênios (E2 e EE2) e 58% para o BPA, valores superiores a fotólise sob radiação UVA, que atingiu 18, e 28% para BPA, E2 e EE2, respectivamente, isso porque o H_2O_2 pode ser facilmente convertido em radicais HO^\bullet quando irradiado por UV, então a adição de H_2O_2 aumenta a taxa de degradação aumentando a concentração de radical hidroxila (ZHANG et al, 2010).

Huang et al. (2010) observaram que a degradação por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVA}$ de $43.8\text{ }\mu\text{M}$ de BPA com 2mM de H_2O_2 em pH 8 foi de 65% em 3 horas de experimento. Por outro lado, no processo de fotólise UVA os autores não observaram degradação significativa com uso da radiação UVA isoladamente. Apesar do H_2O_2 sofrer fotólise e conseqüentemente gerar radicais hidroxilas em 254 nm, o tratamento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVA}$ foi capaz de aumentar a eficiência do tratamento em relação a fotólise UVA e H_2O_2 no escuro. A Tabela 15 mostra o consumo H_2O_2 para os testes realizados em presença de radiação UVA nos 3 valores de pH avaliados.

Tabela 15: Consumo de H_2O_2 no processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVA}$ em água ultrapura dos DEs.

Condições	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ inicial mg.L^{-1}	Consumido (%)
pH 5	3	23
	30	17

pH 7	3	23
	30	18
pH 9	3	22
	30	19

4.2.1.3. H₂O₂/UVC

Os experimentos utilizando radiação UVC também ocorreram na presença de 3 e 30 mg.L⁻¹ de H₂O₂ e nos pH 5, 7 e 9. As Figuras 16 e 17 apresentam a fotodegradação do BPA, E2 e EE2 em função do tempo para as concentrações 3 e 30 mg.L⁻¹ de H₂O₂, respectivamente.

Figura 16: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H₂O₂/UVC em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: [H₂O₂] = 3 mg.L⁻¹; T=25⁰C.

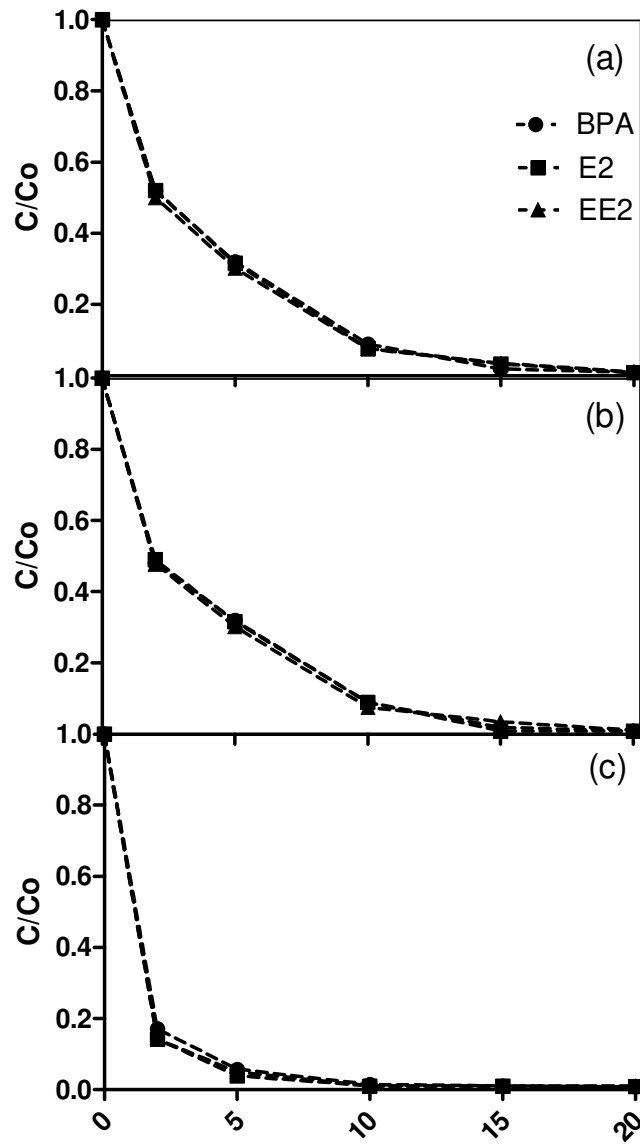
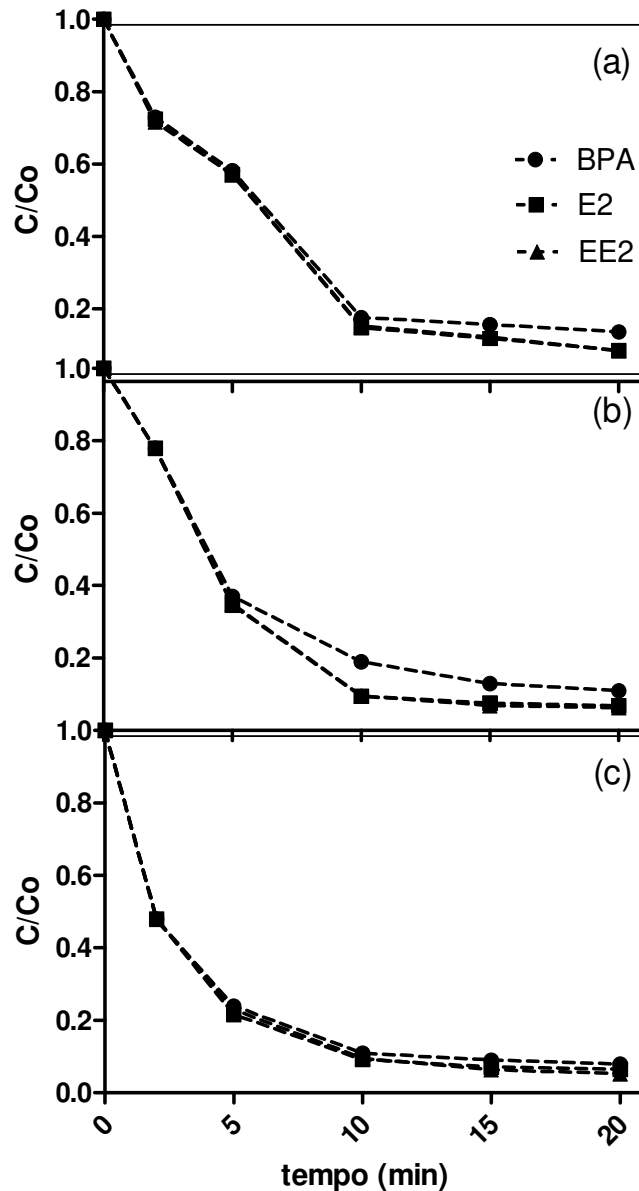


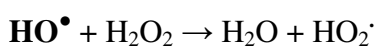
Figura 17: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H_2O_2/UVC em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[H_2O_2] = 30 \text{ mg.L}^{-1}$; radiação UVC; $T=25^{\circ}\text{C}$.



Na concentração 3 mg.L^{-1} de H_2O_2 para todos os valores de pH avaliados em 20 minutos de tratamento, os desreguladores endócrinos foram removidos para valores abaixo do limite de detecção do método ($\text{LD} = 0,84; 0,22 \text{ e } 0,25 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$, para BPA, E2 e EE2, respectivamente). Ma et al. (2015) ao avaliarem a degradação do E2 e EE2 ($50\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada estrogênio) por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ observaram uma remoção de 73% em 120 minutos de tratamento, utilizando 5 mg.L^{-1} de H_2O_2 . Enquanto Andreozzi et al. (2003), avaliaram a degradação do paracetamol (10^{-5}M), em água destilada, usando $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ em pH 5, monitorando a redução do composto bem como a redução de COT, houve rápida remoção do composto (mais de 90% em pouco mais de 1 minuto) e a mineralização de 21% após 4 minutos de reação. Além disso, o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio de $5,0 \times 10^{-3}$ para $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$,

aumentou a mineralização de 21 para 40%, refletindo, porém, houve um aumento pequeno na degradação do paracetamol. Em outra pesquisa realizada por Vogna et al. (2004), os autores estudaram a degradação da carbamazepina (2×10^{-2} mM) em água destilada, utilizando $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ (254nm e 5mM de H_2O_2) com o pH da solução mantido em 5. A degradação do composto foi completa em 4 minutos de reação e a concentração de COT diminuiu de 35% no mesmo período.

Nesse estudo, na concentração 30 mg.L^{-1} de H_2O_2 a máxima remoção alcançada foi de 97% em pH 9, demonstrando que o aumento da concentração de H_2O_2 de 3 para 30 mg.L^{-1} não afeta positivamente a eficiência do processo. Isso porque quando em excesso, o H_2O_2 age como um sequestrante de radicais hidroxila e ao reagir com o HO^\bullet , forma o radical hidroperoxila (HO_2^\bullet), menos reativo ($E_0 = + 1,42 \text{ V}$) que o HO^\bullet ($E_0 = + 2,80 \text{ V}$), diminuindo assim a eficiência do processo (Equação 14), prejudicando a eficiência do processo (SHARMA, 2015; HUANG e SHU, 1995).



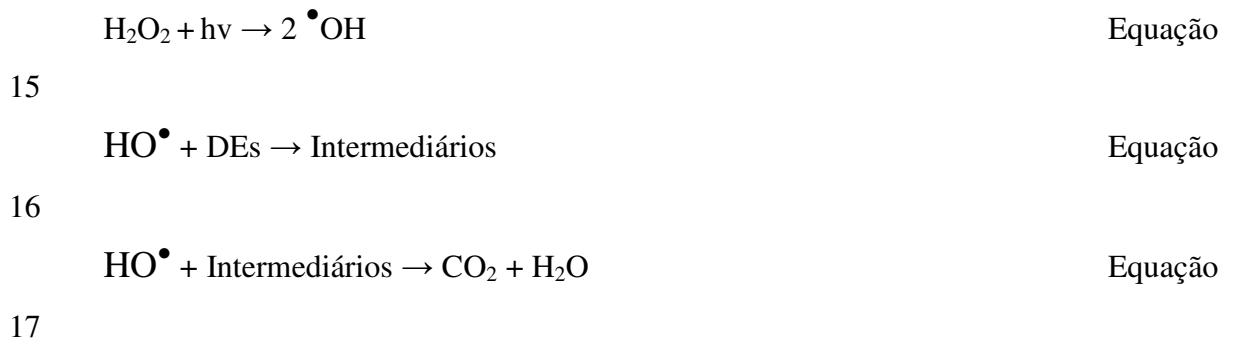
Equação 14

Comprovando os efeitos do excesso de H_2O_2 no processo de degradação dos compostos, Hansen e Andersen (2012) analisaram a eficiência do processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ para as concentrações 10, 30, 60 e 100 mg.L^{-1} de H_2O_2 na degradação de BPA, E2 e EE2 e concluíram que o aumento da concentração de H_2O_2 de 10 até 60 mg.L^{-1} foi acompanhada do aumento da degradação dos compostos, porém ao adicionar 100 mg.L^{-1} de H_2O_2 os compostos sofreram redução na eficiência de degradação em comparação ao valor 60 mg.L^{-1} . Outros estudos mostraram que excesso de peróxido de hidrogênio inibe inversamente a taxa oxidação dos compostos (INCE,1999; MURUGANANDHAM e SWAMINATHAN, 2004; YUE e LEGRINI, 1992).

Além disso, para as duas concentrações (3 e 30 mg.L^{-1} de H_2O_2) os melhores valores de degradação dos DEs foram encontrados em pH 9. Corroborando com esses resultados, Frontistis et al. (2015) ao estudarem a eficiência do tratamento em pH 3, 5 e 8 na remoção de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de EE2 observaram que a eficiência da remoção aumentou conforme o aumento do valor de pH, atingindo remoções de 92, 82 e 67% para os valores de pH 8, 5 e 3, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Frontistis et al. (2012), onde o aumento do pH de 5 para 8 fez com que a degradação completa do EE2 ocorresse em 5 minutos, ao invés dos 22 minutos necessários no pH 5, indicando que mudanças no pH podem afetar a taxa de formação de espécies reativas de oxigênio. Ao contrário desses resultados, Sharma et al. (2015) ao avaliar a degradação do BPA ($0,22\text{mM}$) pelo processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$

variando os valores de pH em 5, 7, 10 e 12, observou que a melhor degradação ocorreu na ordem de pH 5>7>10>12 em 350 minutos de tratamento, justificando esse resultado devido a não ação da ação dos íons carbonatos e bicarbonatos, que agem como sequestrantes de radicais hidroxila em valores ácidos de pH, aumentando assim a degradação (CAVALCANTE et al., 2005).

Em comparação a fotólise UVC, o tratamento UVC/H₂O₂ obteve maior eficiência, em 20 minutos de tratamento a remoção do EE2 aumentou de 20 para 100%, a razão foi que H₂O₂/UVC é capaz de gerar rapidamente mais radicais hidroxila sob irradiação UV do que apenas UV, o que poderia ser explicado pelas Equações 15 – 17 (ZHANG et al., 2010). Hanci et al. (2014) compararam a eficiência na degradação de 20 mg.L⁻¹ de BPA além da redução do COT a partir dos processos UVC e H₂O₂/UVC (2,5mM de H₂O₂) e observaram que a fotólise alcançou remoção de 52% de BPA e 10% de COT, enquanto a fotodegradação removeu completamente o BPA, e 85% do COT em 120 minutos de tratamento.



Comparado ao tratamento com H₂O₂/UVA, a eficiência de degradação aumentou de 35 para 100% em 20 minutos de reação, em pH 9 e concentração 3 mg.L⁻¹ de H₂O₂, isso ocorre porque apesar do H₂O₂ ser fotoreativo em uma faixa de comprimento de onda entre 185-400 nm, os comprimentos de onda ultravioleta de baixa energia (200-280 nm) resultam em maiores rendimentos de geração de radical hidroxila (BRAUN, 1997). Ao comparar a degradação do EE2 pelos processos H₂O₂/UV utilizando radiação UVA e UVC, Frontistis et al. (2015) observaram um aumento da eficiência de remoção de 17 para 47% comparando a radiação UVA com a radiação UVC, após 60 minutos de tratamento. A Tabela 16 apresenta o consumo H₂O₂/UVC, entre 20% e 28% do oxidante foi consumido durante o processo.

Tabela 16: Consumo de H₂O₂ no processo H₂O₂/UVC em água ultrapura com os DEs.

Condições	[H ₂ O ₂] inicial mg.L ⁻¹	Consumido (%)
-----------	---	---------------

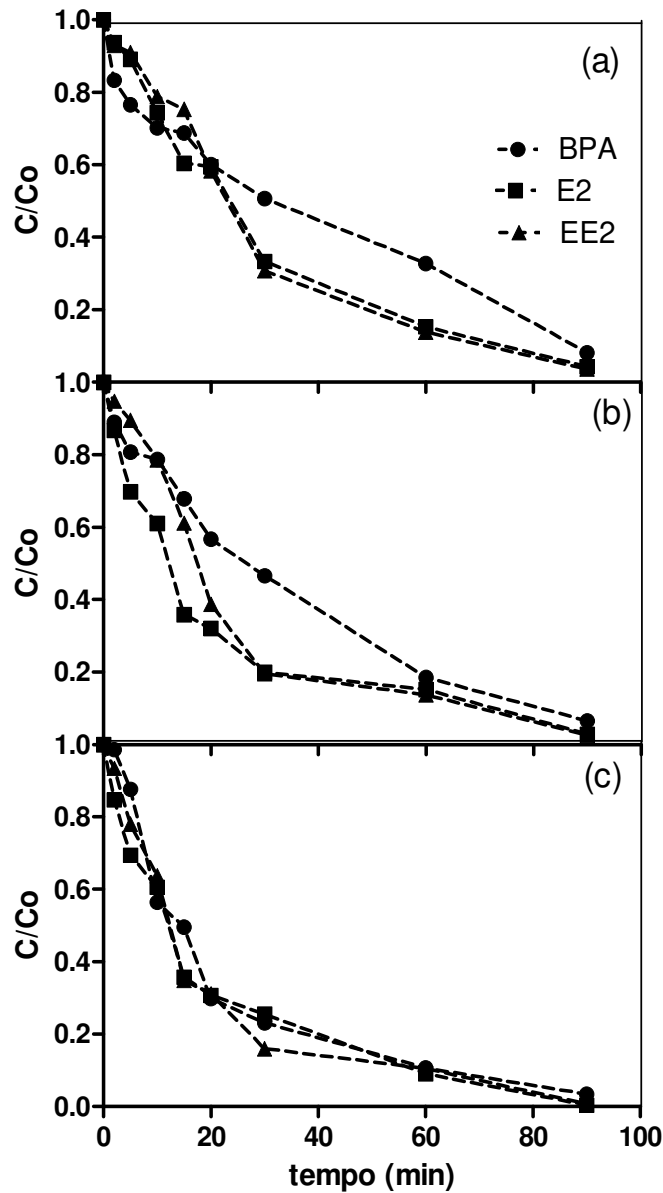
pH 5	3	20
	30	23
pH 7	3	22
	30	26
pH 9	3	23
	30	28

4.2.2. Matriz água residual

O uso de água ultrapura para simular águas naturais possui limitações, uma vez que águas naturais possuem substâncias dissolvidas, suspensas e outras substâncias inorgânicas que podem afetar a degradação dos DEs estudados (KOUTANTOU et al, 2013; SILVA et al, 2012; XEKOUKOULOTAKIS et al, 2011). O ensaio com água residual, coletada pós-tratamento de lodos ativados no decantador secundário, foi realizado com 3mg.L^{-1} de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$, variando o valor do pH em 5, 7 e 9 e $100\ \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto (BPA, E2 e EE2). Os gráficos que apresentam a evolução da degradação do DEs no tempo de tratamento estão apresentados na Figura 18.

Os resultados indicam que em 90 minutos de tratamento os compostos atingiram remoção finais similares. A Figura 18(a), na qual mostra que E2 e EE2 foram 99% removidos, enquanto o BPA foi 98% degradado em pH 5. Seguindo o comportamento dos experimentos realizados em água ultrapura, a melhor condição de degradação em efluente ocorreu em pH 9 (Figura 18 (c)), quando todos os DEs foram removidos a valores abaixo do limite de quantificação. Resultado semelhante foi encontrado por Polo et al. (2013) ao avaliaram a remoção do BPA ($10\ \text{mg.L}^{-1}$) em água residual proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais localizada em Granada, através do processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ($500\ \mu\text{M}$) e observaram a completa remoção do composto em 90 minutos de tratamento.

Figura 18: Degradação de BPA, E2 e EE2 por H_2O_2/UVC em água residual de estação de tratamento de esgoto (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[H_2O_2] = 3mg.L^{-1}$; $T=25^0C$.



Devido à complexidade da matriz, o tempo de tratamento aumentou de 20 para 90 minutos em relação a água ultrapura, adotando condições iniciais experimentais similares (Figura 16, item 4.2.1.3). A diferença do tempo de reação está relacionada com a diminuição da concentração de HO^\bullet disponível para reagir com os compostos e com agente oxidante

devido à presença de interferentes como matéria orgânica dissolvida, turbidez, bicarbonatos e cloretos que agem como sequestrantes de radicais HO^\bullet para formar espécies reativas de oxigênio, cujo potencial de oxidação é inferior ao HO^\bullet (SIRTORI, 2010). Cedat et al. (2016) ao avaliarem a influência da matriz aquosa na remoção dos estrogênios E1, E2 e EE2 em água potável e água residual pelo processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ (40 mg.L^{-1}) observaram redução 10% na degradação dos compostos em água residual em comparação a água potável. Essa perda de eficiência também foi comprovada por Hansen e Andersen (2012) ao comparar a remoção de E2, EE2 e BPA em água da torneira e em água residual, proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais localizada na Dinamarca. O tratamento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ (60 mg.L^{-1}) demonstrou redução na degradação dos três compostos em água residual. Em relação ao BPA a eficiência caiu em 23% comparando a degradação em água da torneira e água residual, enquanto para o E2 e EE2 essa redução foi de 15 e 18%, respectivamente.

A caracterização química e microbiológica da água residual antes, durante e depois do tratamento foi realizada para o experimento em pH 9, e está apresentada na Tabela 17. O parâmetro nitrogênio total teve um aumento nos primeiros 10 minutos de tratamento e os valores se mantiveram praticamente constantes até o fim do experimento. Carbono total (CT) e carbono orgânico total (COT) tiveram uma redução de 37%, indicando que poderia ter ocorrido mineralização dos compostos durante o processo de fotodegradação. Enquanto os parâmetros físico-químicos restantes mantiveram-se constantes ao longo do experimento.

Hanci et al. (2014) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar a remoção de COT pelo processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ de uma amostra de BPA (20 mg.L^{-1}) em água natural de uma estação de tratamento de água localizada em Istambul. Em 120 minutos de tratamento a remoção de COT foi de 45%, entretanto ao alterar a matriz para água ultrapura alcançou 85% de remoção. Valores de remoção de COT mais baixos foram obtidos por Frontistis et al. (2015), que observaram uma remoção inferior a 10% na água residual, coletada numa estação de tratamento na Grécia, em presença de EE2 ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) para o tratamento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$.

A eficiência da desinfecção por meio do processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ foi realizado pela quantificação de *E. coli* e coliformes totais na água residual. Os resultados indicaram a remoção total de ambos os parâmetros nos primeiros minutos do processo, indicando que o processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ é eficiente tanto para degradação de DEs como para desinfecção de água residual.

Tabela 17: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nos tempos 0, 10, 45 e 90 minutos de tratamento H₂O₂/UVC em água residual.

		t = 0	t = 10 min	t = 45 min	t = 90 min
Parâmetros físico-químicos (mg.L ⁻¹)	Carbono orgânico total (COT)	20,31	18,23	15,89	12,83
	Cloreto	53	53	53	54
	Nitrito	0,4	0,4	0,4	0,4
	Nitrato	1,2	1,6	1,6	1,3
	Fosfato	1,2	1,1	1,3	1,3
	Sulfato	21	21	21	21
	Parâmetros Microbiológicos (número mais provável)	Coliformes totais	50,5 x 10 ⁴	0	0
<i>Escherichia Coli</i>		17,05 x 10 ⁴	0	0	0

No presente estudo, o consumo de H₂O₂ após diferentes tratamentos está apresentado na Tabela 18, que demonstra que esse foi parcialmente consumido apesar das altas remoções dos compostos atingidas. Esses valores são maiores do que encontrados por Hansen e Andersen (2012), que realizaram experimentos e observaram consumo 21% de H₂O₂ (concentração inicial de 60 mg.L⁻¹) em água potável e 11% de águas residuais.

Tabela 18: Consumo de H₂O₂ no processo H₂O₂/UVC em água residual

Condições	[H ₂ O ₂] inicial mg.L ⁻¹	Consumido (%)
pH 5	3	29
pH 7	3	31
pH 9	3	31,5

4.2.3. Ensaio *in vitro* YES

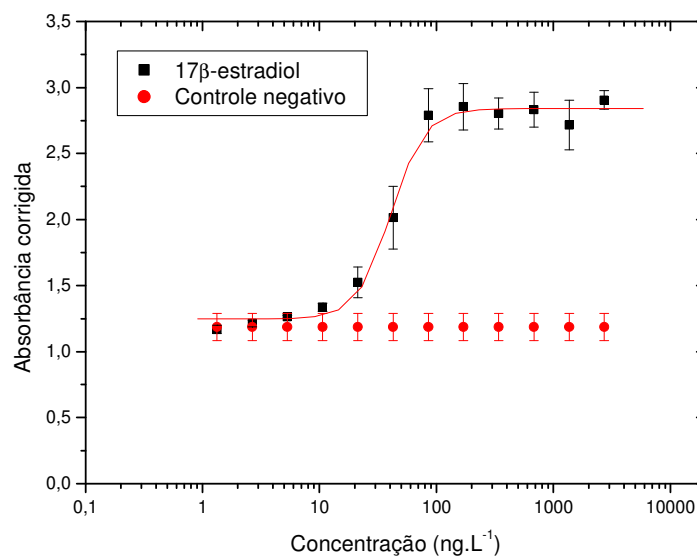
O Ensaio *in vitro* YES foi realizado para a condição de tratamento que resultou em melhores remoções dos desreguladores BPA, E2 e EE2, variando o pH em 5, 7 e 9.

As análises foram realizadas a partir de uma solução $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto (BPA, E2 e EE2) em água ultrapura com 3 mg.L^{-1} de H_2O_2 e radiação UVC. As amostras foram analisadas imediatamente antes do experimento (tempo 0), após 5 e 20 minutos de tratamento.

4.2.3.1. Controle positivo 17 β -estradiol

Foi obtida uma curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol, produzida na faixa de 2724 a $1,33 \text{ ng.L}^{-1}$. O limite de detecção do ensaio foi de $10 \pm 3 \text{ ng.L}^{-1}$ e o limite de quantificação $30 \pm 10 \text{ ng.L}^{-1}$ (Figura 19). A média do CE_{50} do controle positivo foi de $53,5 \text{ ng.L}^{-1}$, enquanto a média do CE_{50} do BPA e EE2 foi de $73251,9 \text{ ng.L}^{-1}$ e $42,7 \text{ ng.L}^{-1}$, respectivamente. A potência relativa do BPA, E2 e EE2 foi de 7×10^{-4} ; 1 e 1,25, respectivamente.

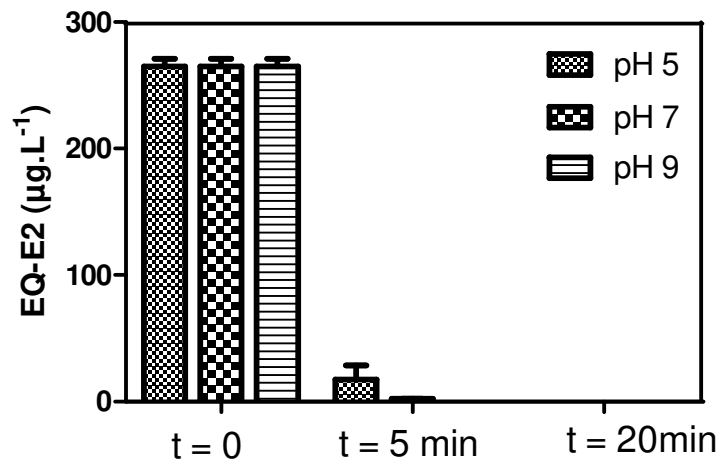
Figura 19: Curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol no ensaio YES.



4.2.3.2. Determinação da atividade estrogênica durante processo H₂O₂/UVC

Análises biológicas e químicas são de grande importância nesse trabalho, pois fica evidente que a redução da atividade estrogênica ocorreu devido a remoção dos desreguladores endócrinos e que subprodutos formados durante a fotodegradação não apresentaram atividade estrogênica, como pode ser visualizado na Figura 20. A Figura 20 mostra os valores de equivalente 17 β -estradiol (EQ-E2) encontrados para cada tempo de tratamento analisado, de acordo com o pH. O Anexo 2 mostra as curvas dose-resposta dos experimentos de acordo com cada pH.

Figura 20: Valores de EQ-E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em 0, 5 e 20 minutos de tratamento H₂O₂/UVC; condições iniciais: [H₂O₂] = 3 mg.L⁻¹, pH 5, 7 e 9.



Os resultados demonstram que a mistura aquosa de BPA, E2 e EE2 (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto) apresentaram atividade estrogênica, no valor de 265 \pm 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Após 5 minutos de tratamento, o valor de EQ-E2 foi reduzido para 17,62 \pm 1,2 $\mu\text{g/L}$ em pH 5, para 2,13 \pm 0,10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no experimento realizado em pH 7 e abaixo do limite de detecção para pH 9. A remoção da atividade estrogênica foi comparativamente maior do que a remoção dos compostos, como pode ser observado pela Figura 16, item 4.2.1.3 que mostra a remoção dos compostos por tempo, nos experimentos em pH 5 e 7 após 5 minutos de tratamento os

compostos foram parcialmente removidos (76 e 70% para pH 5 e 7, respectivamente), enquanto a remoção da atividade estrogênica foi de 94 e 99% para pH 5 e 7, respectivamente. Dessa maneira a atividade estrogênica foi parcialmente removida, em pH 9 os compostos foram removidos abaixo do limite de quantificação do método, resultando em valores de atividade estrogênica abaixo do limite de detecção. Em 20 minutos de tratamento (figura 16), os compostos foram removidos abaixo do limite de quantificação, resultando em valores de EQ-E2 igualmente abaixo do limite de detecção do ensaio *in vitro* YES, demonstrando a eficiência do tratamento para remoção dos compostos avaliados e não formação de subprodutos estrogênicos. A atividade estrogênica de um composto ou mistura é analisada através da comparação entre a estrutura química do 17 β -estradiol com a estrutura química do DE, destacando o grupo fenólico, que se liga ao receptor de estrogênio, traduzindo-se na ocorrência de estrogenicidade (BIRKETT e LESTER, 2003; KIDD et al., 2012). Dessa maneira a redução da atividade estrogênica das amostras demonstra que ocorreu clivagem ou mineralização do grupo fenólico, comum nos três compostos em análise (BPA, E2 e EE2), isso se justifica pela facilidade do anel aromático em sofrer substituições eletrofílicas, fazendo assim com que o fenol seja altamente suscetível a oxidação por radicais hidroxila (MORAES E AZEVEDO, 2010).

Comparando os resultados obtidos nesse estudo com os de Rosenfelt et al. (2007), temos a redução de 100% de atividade estrogênica pelo processo H₂O₂/UVC (5 mg.L⁻¹ de H₂O₂) na degradação de E2 (3 μ g.L⁻¹) utilizando uma energia de 500 mJ.cm⁻². Zhang et al. (2010) obtiveram resultados similares, com 95% de redução da atividade estrogênica após 40 minutos de tratamento de EE2 (2,63 mg.L⁻¹) em água ultrapura na presença de 5 mg.L⁻¹ de H₂O₂/UVC e pH 6,8. Ainda coincidindo com esses valores, Linden et al. (2007) avaliaram a redução da atividade estrogênica de uma solução de água ultrapura contendo EE2 (1x 10⁻⁸ M) na presença de 5 e 10 mg.L⁻¹ de H₂O₂, e concluíram que atividade estrogênica foi completamente reduzida para os dois valores de H₂O₂ investigados, usando uma energia UV de 200 mJ.cm⁻².

A atividade estrogênica do BPA (20 mg.L⁻¹) foi reduzida em 5 minutos de tratamento em níveis não detectáveis após tratamento H₂O₂/UVC em água ultrapura (HANCI et al, 2014). Outros trabalhos obtiveram resultados semelhantes para diminuição da atividade estrogênica paralelamente a degradação do BPA (CHEN et al., 2006; NEAMTU e FRIMMEL, 2006; FRONTISTIS et al., 2011).

Já em água residual, Cedat et al. (2016) compararam a eficiência de redução da atividade estrogênica utilizando duas concentrações de H₂O₂ (30 e 50mg.L⁻¹) em uma mistura contendo E1, E2 e EE2 (5 μ M) após processo H₂O₂/UVC a 1000mJ.cm⁻². Para as duas

concentrações de H_2O_2 estudadas, a remoção da atividade estrogênica foi maior do que 90%, indicando que além da eficiência de remoção dos compostos o tratamento não formou subprodutos estrogênicos. Esses resultados foram melhores do que os encontrados por Chen et al. (2007) com a redução de cerca de 80% da atividade estrogênica de uma mistura de E2 (200 ng.L^{-1}) e EE2 (1000 ng.L^{-1}) em água superficial nas condições de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mg.L}^{-1}$ e 1000 mJ.cm^{-2} .

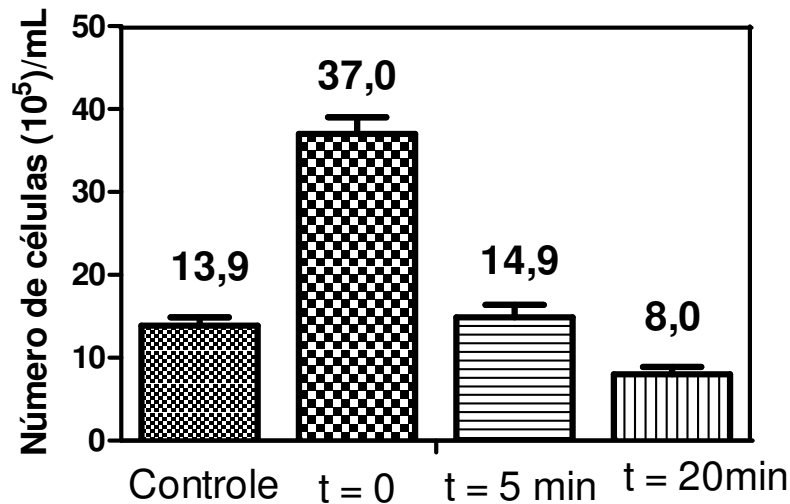
4.2.4. Ensaios Ecotoxicológicos

As múltiplas transformações que ocorrem nos POAs nem sempre são conhecidas, logo para garantir a eficiência de um processo é necessário avaliar a toxicidade dos subprodutos gerados ao longo do processo. A toxicidade crônica de uma solução $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada DE em água ultrapura, foi avaliada por ensaios com os organismos testes *Raphidocelis subcapitata* e *Ceriodaphnia dubia* antes, durante e após os experimentos $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 3 \text{ mg.L}^{-1}$, pH 9) em 0, 5 e 20 minutos de tratamento.

4.2.4.1. Organismo-teste alga *Raphidocelis subcapitata*

A Figura 21 apresenta a contagem de células para cada ml da cultura após 72 horas de ensaio. A mistura aquosa de BPA, E2 e EE2 apresentou estímulo de crescimento das células, o que segundo Li et al. (2017b) se deve a presença de BPA na solução que funciona como agente estimulante. Em 5 minutos de tratamento também foi observado estímulo de crescimento, entretanto menor do que antes do tratamento pois a concentração de BPA disponível era menor (Figura 16 (c), item 4.2.1.3), tendo em vista que os compostos foram parcialmente degradados. Ao fim do tratamento, em 20 minutos, a cultura de células apresentou inibição de 42% no crescimento, isso pode ser explicado pela formação de subprodutos tóxicos ao organismo teste avaliado.

Figura 21: Resultados dos testes de toxicidade crônica com *Raphidocelis subcapitata* durante a fotodegradação H₂O₂/UVC; condições iniciais: [H₂O₂] = 3mg.L⁻¹, pH 9.



4.2.4.2. Organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*

Os organismo-testes apresentaram elevada sensibilidade a mistura de compostos avaliados antes do tratamento, a solução com 100 µg.L⁻¹ de cada composto levou a morte de 60% dos organismos no terceiro dia de ensaio e ao quarto dia a 100% dos organismos. Isso pode ser explicado pelo efeito sinérgico dos compostos BPA, E2 e EE2, uma vez que estes compostos quando analisados isoladamente em outros estudos apresentam valores de CE₅₀ próximos ao utilizado neste trabalho (SPADOTTO et al. 2017; JUKOSKY et al. 2008; JASER et al. 2003). Para as amostras durante e pós tratamento (t = 5 e 20 minutos), a mortalidade dos organismos atingiu 100% ao terceiro dia de ensaio, o que pode evidenciar a formação de compostos tóxicos oriundos do processo H₂O₂/UVC. Desta forma, a análise crônica de reprodução desta espécie não pode ser feita por ter aparecido um efeito agudo no período inicial do ensaio.

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos indicam a importância de realização conjunta desse ensaio com a análise de atividade estrogênica, uma vez que o processo H₂O₂/UVC foi eficiente da remoção, mineralização, desinfecção e eliminação da atividade estrogênica, porém gerou subprodutos tóxicos para os organismos analisados.

4.3. Degradação dos desreguladores endócrinos por Cl/UV

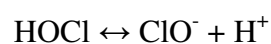
4.3.1. Matriz água ultrapura

A degradação dos DEs BPA, E2 e EE2 por Cl/UV na concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto em água ultrapura foi realizada a partir do Hipoclorito de sódio 5%, resultando em concentrações de 1 e 2 mg.L^{-1} de cloro livre na ausência de radiação, sob radiação UVA e UVC e diferentes pH (5, 7 e 9).

4.3.1.1. Ausência de radiação

A partir de uma solução contendo 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de BPA, E2 e EE2 foram realizados ensaios em presença do agente oxidante cloro na ausência de radiação ultravioleta durante 30 minutos. As Figuras 22 e 23 apresentam os resultados obtidos na presença de 1 e 2 mg.L^{-1} de cloro livre, respectivamente para os valores de pH 5, 7 e 9.

A Figura 22 (a) mostra que a degradação dos compostos foi de 78% no pH 5. A melhor condição de ensaio foi obtida na concentração 2 mg.L^{-1} de cloro em valor de pH 7, onde em 30 minutos de reação todos os compostos atingiram 97% de remoção, consumindo metade da concentração de cloro total disponível. As Figuras 22 e 23 demonstram ainda que melhores remoções são obtidas em pH neutro, seguidas pelo pH 5 e posteriormente pH 9. Isso ocorre devido a dissociação do ácido hipocloroso em ânions de hipoclorito, como apresentado pela Equação 18. No ensaio em pH 7 a espécie dominante é o ácido hipocloroso, que possui maior rendimento quântico e menos efeito sequestrante de radical $\text{HO}\cdot$ do que o ânion hipoclorito, fazendo com que a maior eficiência de tratamento seja alcançada em pH neutro e com tendência de diminuição em pH básicos (MORRIS, 1966; DEBORDE E VON GUNTEN, 2008; NOWELL e HOIGNÉ, 1992).



Equação

Figura 22: Degradação de BPA, E2 e EE2 por cloração em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$.

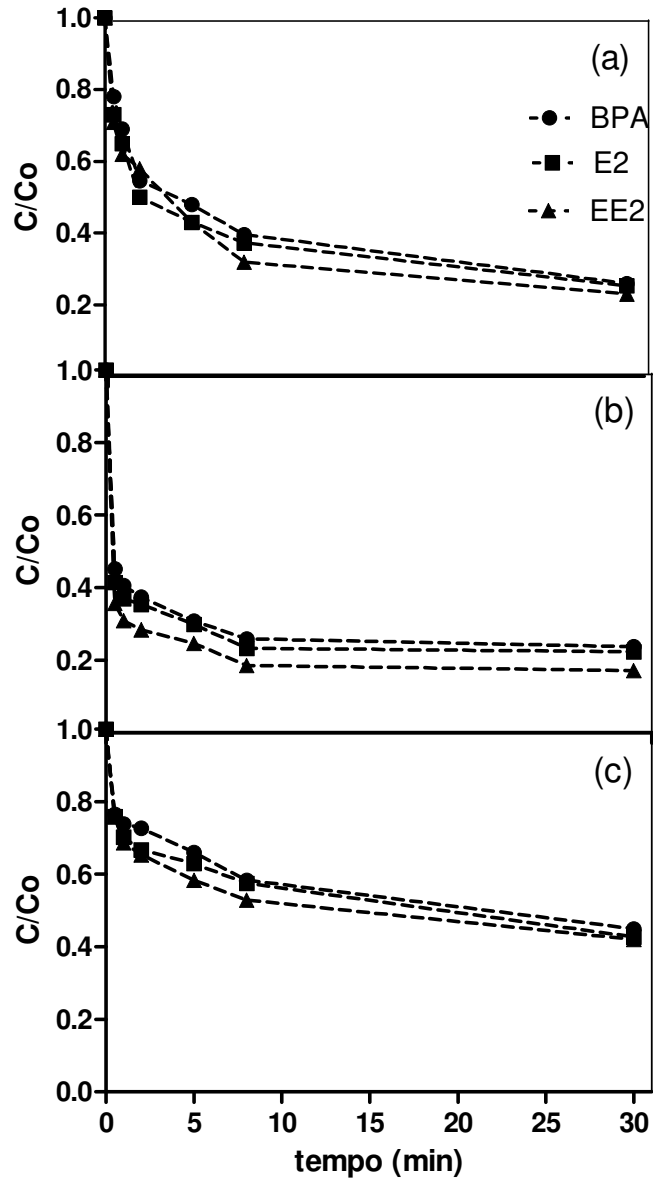
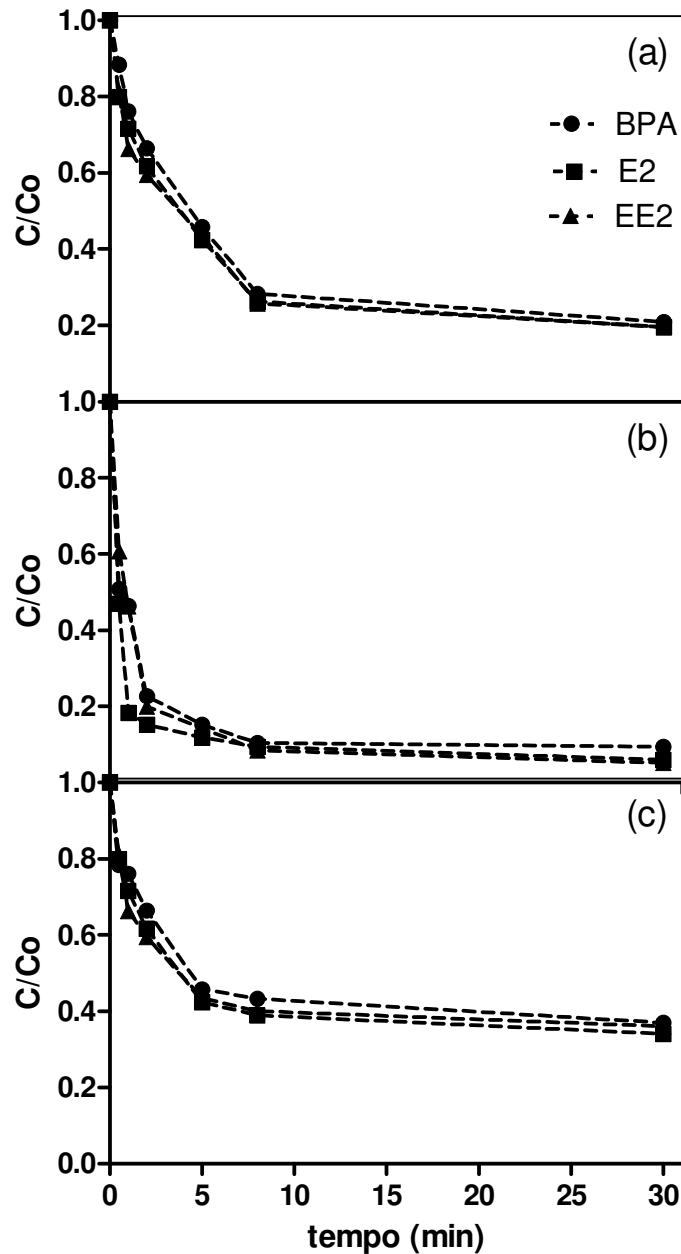


Figura 23: Degradação de BPA, E2 e EE2 por cloração em água ultrapura (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$.



Alum et al. (2004) estudaram o processo de cloração para BPA, E2 e EE2 (100nM) em água ultrapura e pH 7,5. Em presença de 1 mg.L^{-1} de cloro, os estrogênios E2 e EE2 foram removidos abaixo do limite de detecção, enquanto o BPA sofreu 92% de degradação após uma hora de reação. Em testes complementares, foi avaliada a degradação dos compostos para

as concentrações 0,25, 0,50, 1 e 2 mg.L⁻¹ de cloro e ao final de 4 dias de experimento todos os compostos haviam sido removidos abaixo do limite de detecção.

Resultados similares foram encontrados por Pereira et al. (2013) ao avaliar a degradação do E2 (100µg.L⁻¹) em presença de 1 mg.L⁻¹ de cloro em água de poço, obtiveram 94% de degradação em 30 minutos de tratamento e 98% em presença de 2 mg.L⁻¹ de cloro. Hu et al. (2003) também estudaram a degradação do E2 por cloração e relataram que 100% de E2 (50 mg.L⁻¹) foi degradada após 10 min de reação em pH 7,5 na presença de 1,30 e 1,46 mg.L⁻¹ de cloro (HU et al., 2003; LI et al., 2012). Outro trabalho para avaliar o processo de cloração foi realizado por Bianchetti (2008) e demonstrou que o EE2 em água destilada foi 95% removido por meio da cloração em presença de 3 mg.L⁻¹ de cloro após 30 minutos de contato.

Somente a cloração é capaz de degradar os compostos devido a estrutura química dos compostos, rica em fenóis, que são atacados preferencialmente pela molécula seletiva do cloro (LEE e VON GUNTEN, 2010). Segundo Li et al. (2017a) a degradação ocorre primeiramente pela halogenação do anel aromático, seguida da clivagem do anel de benzeno que permite a substituição dos átomos de carbono pelo cloro, formando os compostos trialometanos e ácidos acéticos halogenados.

Na Tabela 19 pode ser visualizado a porcentagem de consumo de cloro livre para cada condição de ensaio, para os valores de remoção obtidos nesses experimentos o cloro não foi totalmente consumido em nenhum dos casos.

Tabela 19: Consumo de cloro no processo de cloração em água ultrapura.

Condições	[Cloro] inicial mg.L ⁻¹	Consumido (%)
pH 5	1	48
	2	51
pH 7	1	49
	2	50
pH 9	1	48
	2	50

4.3.1.2. Cl/UVA

Esses experimentos foram realizados nas condições: concentração 1 e 2 mg.L⁻¹ de cloro livre, valores de pH 5, 7 e 9, radiação UVA em água ultrapura para 20 minutos de tratamento. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 25 e 26, onde pode-se concluir que a concentração onde ocorre a maior fotodegradação foi de 2 mg.L⁻¹ de cloro livre e pH 7. A Figura 24 mostra que a remoção dos compostos foi de 95, 99 e 94% para os valores de pH 5, 7 e 9, respectivamente. Enquanto, a Figura 25 mostra que em 20 minutos de tratamento todos os compostos foram removidos abaixo do limite de quantificação do método.

O aumento da eficiência do processo devido ao aumento da concentração do agente oxidante cloro tem sido verificada por muitos autores, Wang et al. (2016) verificaram um aumento de 57% na cinética da reação ao aumentar a concentração de cloro de 0,2 para 0,6 mM.

Em comparação com a fotólise utilizando radiação UVA e os experimentos realizados no escuro, esse processo demonstrou maior eficiência. Enquanto a fotólise removeu 28% dos estrogênios em 120 minutos de tratamento, o ensaio de cloração removeu 60% e o processo Cl/UVA removeu 95% em 20 minutos para concentração 1 mg.L⁻¹ de cloro livre em pH 9. A maior eficiência do processo Cl/UVA em relação a cloração e fotólise ocorre porque apesar do radical hidroxila não ser seletivo e degradar um ampla gama de poluentes rapidamente, o cloro é mais seletivo, degradando o grupo fenol, em especial, mais rapidamente do que o HO[•]. Dessa maneira, o processo Cl/UVA combina as vantagens do cloro disponível na cloração e do radical hidroxila, tornando esse processo mais eficiente que a cloração ou fotólise, isoladamente. (WATTS e LINDEN, 2007; FANG et al., 2014). Com a Tabela 20 pode ser visualizado a porcentagem de consumo de Cl para os experimentos realizados, em nenhum dos casos o consumo ultrapassou 47%.

Figura 24: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVA em água ultrapura; (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1\text{mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$

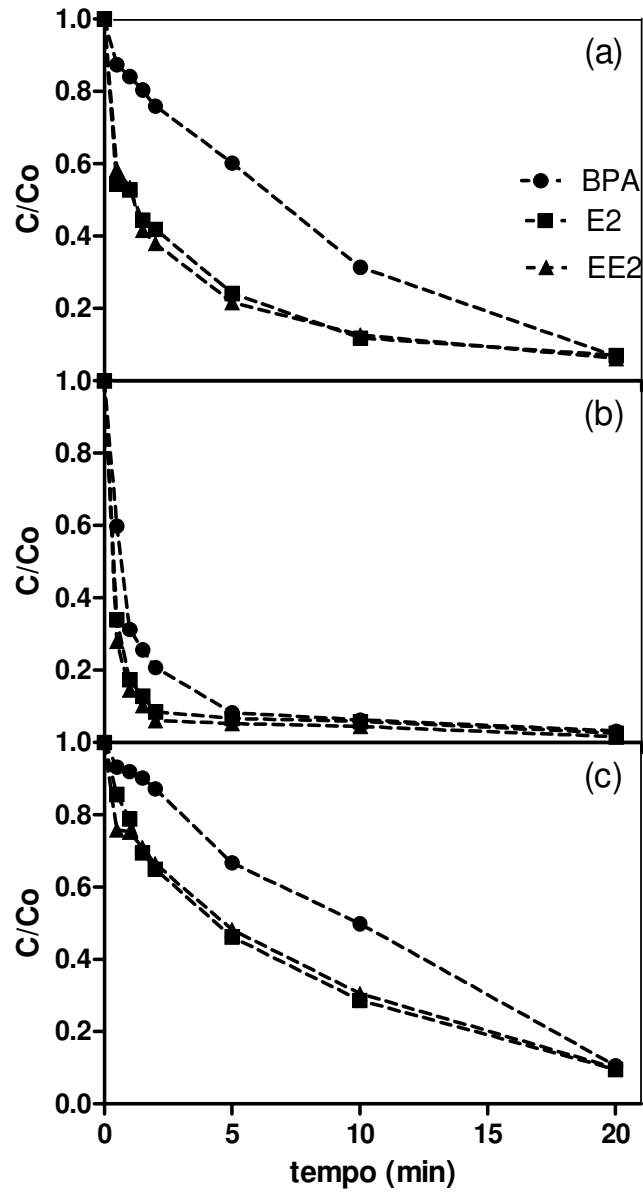


Figura 25: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVA em água ultrapura; (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$

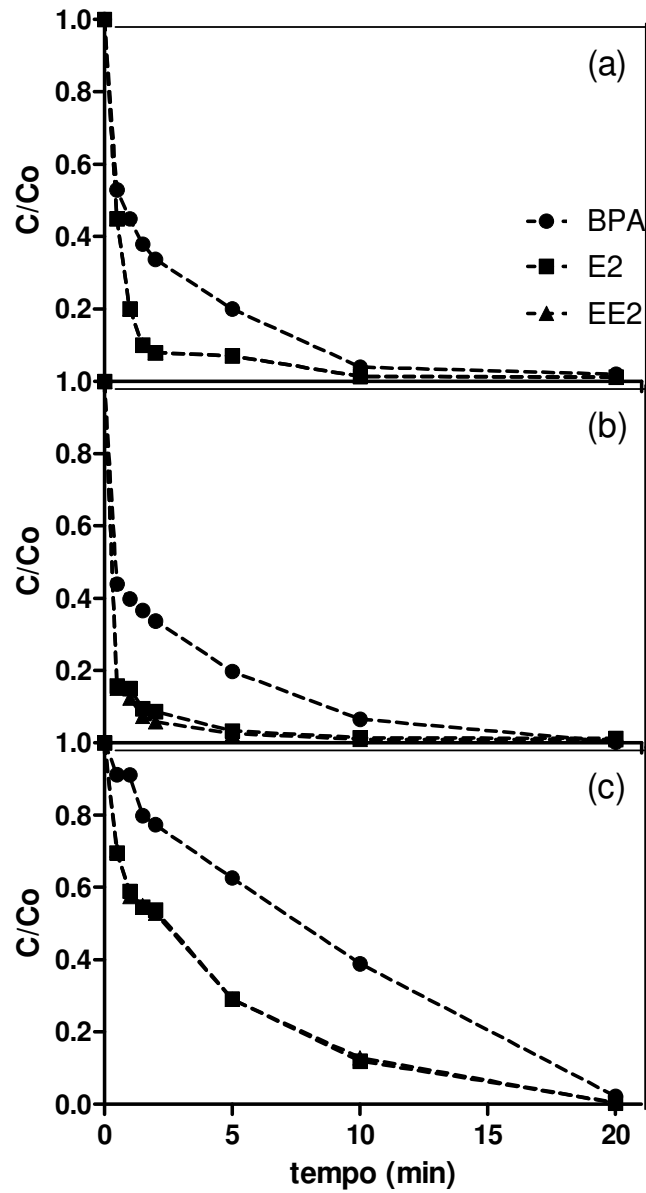


Tabela 20: Consumo de Cloro no processo Cl/UVA em água ultrapura.

Condições	$[Cloro]_{inicial} \text{ mg.L}^{-1}$	Consumido (%)
pH 5	1	46
	2	45
pH 7	1	45
	2	47
pH 9	1	44
	2	44

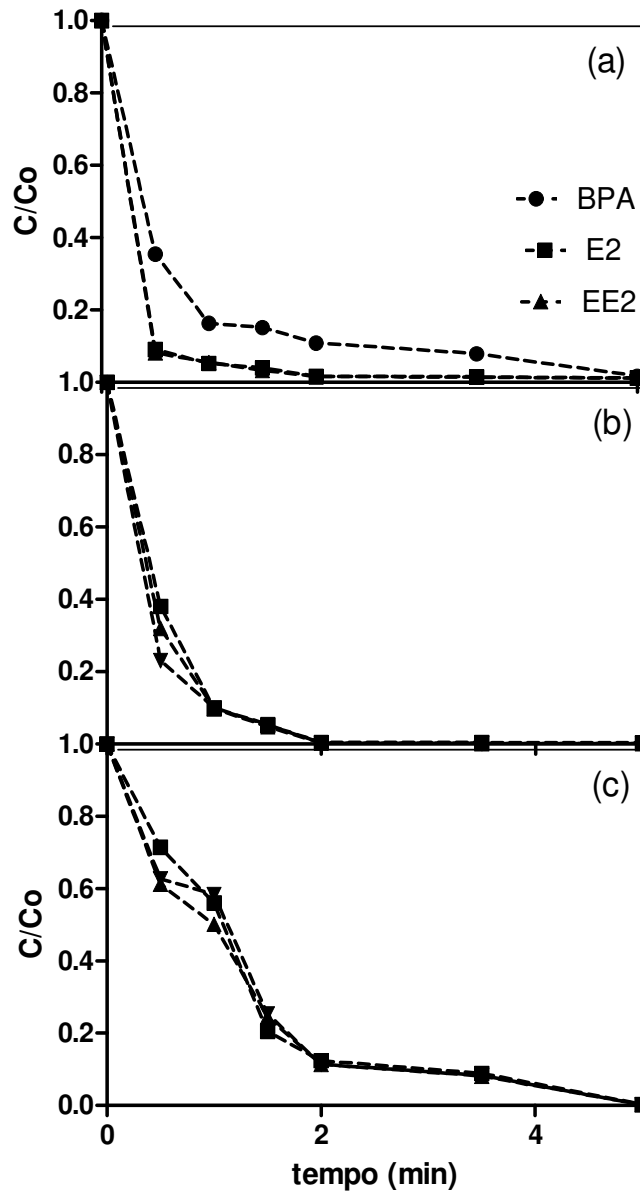
4.3.1.3. Cl/UVC

5.

Os experimentos utilizando radiação UVC também ocorreram em presença de 1 e 2 mg.L⁻¹ de cloro livre e valores de pH 5, 7 e 9. Os experimentos para degradação de 100 µg.L⁻¹ de BPA, E2 e EE2 ocorreram em 5 minutos e as coletas realizadas em intervalos de 30 segundos. As Figuras 26 e 27 expressam a remoção de BPA, E2 e EE2 pelo tempo para as concentrações 1 e 2 mg.L⁻¹ de cloro livre, respectivamente. Em todos os experimentos os compostos foram removidos em concentrações abaixo do limite de quantificação. Para as duas concentrações e radiações analisadas a maior eficiência de tratamento foi alcançada em pH 7, podendo ser explicado pelo fato da dissociação do ácido hipocloroso em ânions de hipoclorito (pKa 7,5) ser afetado pelo pH, e os rendimentos quânticos de ácido hipocloroso a 254 nm em temperatura ambiente serem muito superiores ao do anión hipoclorito (WATTS e LINDEN, 2007). Além disso, as constantes de velocidade de HOCl com HO[•] e Cl⁻ são mais lentos do que os de OCl⁻, tornando o processo mais lento para valores de pH alcalinos e ácidos. (CONNICK, 1947; ZEHAVI e RABANI, 1972; JAYSON et al., 1973; MATTEW e ANASTASIO, 2006).

Os resultados encontrados foram bem semelhantes com os encontrados por Kong et al. (2016), quando a eficiência de degradação de Atrazina (ATZ) por Cl/UVC aumentou de 40 para 52% com a diminuição do pH de 9 para 7, comprovando essa teoria, Xiang et. al (2016) obtiveram um aumento de 15 para 30% de remoção do Ibuprofeno (IBP) com o aumento do valor do pH de 6 para 7.

Figura 27: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVC em água ultrapura; (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2\text{mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$.



O processo Cl/UVC foi mais eficiente do que a fotodegradação Cl/UVA, ao comparar a remoção em 5 minutos de tratamento a 2mg.L^{-1} de cloro livre e pH 5, a concentração dos DEs atingiu valores abaixo do limite de quantificação do método para UVC e 90 e 80% de remoção para os estrogênios e BPA, respectivamente para radiação UVA. Isso pode ser explicado pela máxima absorção do BPA, E2 e EE2 no comprimento de onda da radiação UVC (SANTOS, 2016; DE LIZ, 2013).

Kong et al. (2016) avaliaram a remoção de 10 mM de Atrazina (ATZ) em pH neutro pelo processo de fotólise e Cl/UVC para diversas concentrações de cloro (20, 50, 70 e 100

μM). Especificamente, na dosagem UV de 500 mJ/cm^2 , o processo degradou ATZ em cerca de 70%, enquanto aproximadamente 40% de ATZ foi removida apenas pela fotólise. Diferentemente dos resultados do presente trabalho a eficiência de degradação em Cloro/UV não foi fortemente dependente da concentração inicial de cloro, especialmente quando o cloro foi adicionado em concentrações superiores a 50 mM. Resultados semelhantes foram encontrados por Fang et al. (2014), ao avaliar a degradação do ácido benzóico por Cl/UVC, concluíram que para concentrações acima de 50 mM de cloro livre a remoção dos composto alvo aumentavam muito lentamente. Entretanto, Rott et al. (2018) concluíram que o aumento da concentração do agente oxidante cloro de 1 para 2 mg.L^{-1} aumentou a eficiência de remoção do BPA de 70 para 80%. A Tabela 21 mostra o consumo de cloro para os experimentos Cl/UVC em água ultrapura.

Tabela 21: Consumo de cloro no processo Cloro/UVC em água ultrapura.

Condições	[Cl] inicial mg.L^{-1}	Consumido (%)
pH 5	1	51
	2	52
pH 7	1	50
	2	50
pH 9	1	49
	2	49

4.3.2. Água da torneira

O tratamento convencional de uma estação de tratamento de água no Brasil passa pelo processo de cloração. Dessa maneira, foram realizados experimentos com a água da torneira, coletada no Centro de pesquisa do trabalhador, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, sem adição de cloro, utilizando apenas o cloro residual livre já presente na água, que apresentou $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloro livre. Os experimentos foram realizados imediatamente após a coleta, no escuro e na presença da radiação UVC, variando o valor do pH em 5, 7 e 9. Os experimentos na ausência de radiação duraram 20 minutos e as coletas foram realizadas a cada 2 minutos, como apresentado na Figura 28, sendo o melhor valor de remoção alcançado em pH 7, com 50% para E2 e EE2 e 46% para BPA, enquanto os experimentos realizados na presença de radiação UVC apresentados na Figura 29, o tratamento durou 10 minutos, e em pH 5 e 7 atingiu concentrações abaixo do limite de quantificação do método, enquanto em pH 9

removeu 99% dos estrogênios e 98% do BPA. Comparando os dois casos (com e sem radiação), os valores de remoção atingidos em água ultrapura foram maiores em comparação a água de torneira. Os valores de remoção relatados só foram atingidos devido a legislação brasileira que permite a presença de até 2 mg.L^{-1} de cloro residual livre em água potável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Figura 28: Degradação de BPA, E2 e EE2 por cloração em água na torneira (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[\text{Cl}] = 1,4 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$.

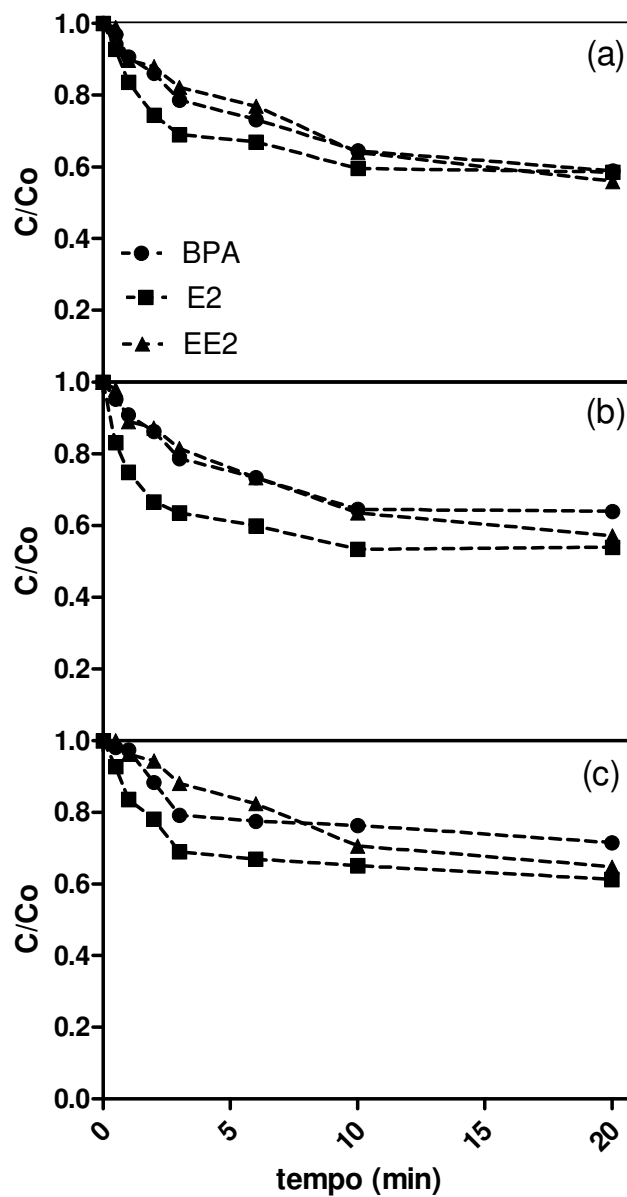
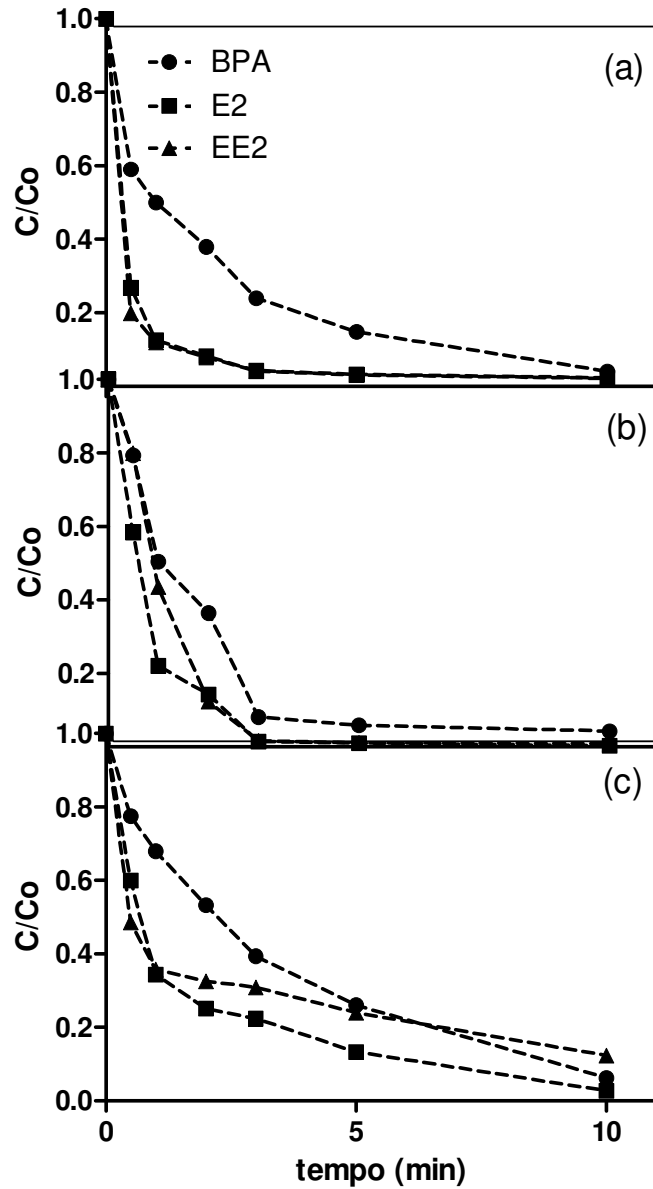


Figura 29: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVC em água na torneira (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 1,4 \text{ mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$.



Li et al. (2017a), avaliaram a degradação do E2 ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) pelo processo de cloração ($0,5 \text{ m.L}^{-1}$ de cloro e pH 6,5) em água da torneira alcançando 90% de remoção em 20 minutos de tratamento. Foi observado também que o aumento do pH para 7,2 elevou a remoção para 97%. Utilizando uma concentração de cloro livre ($6,1 \text{ mg.L}^{-1}$) mais elevada do que o presente estudo, Sichel et al. (2011) analisaram a remoção de diclofenaco, desetilatrizina e sulfamexazol por Cl/UVC, além de avaliar o comportamento do processo ao adicionar 40

mg.L⁻¹ de ureia e 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, resultando em 46 mg.L⁻¹ de COT. O diclofenaco e sulfamexazol foram 100% removidos tanto para água enriquecida, quanto para água ultrapura, entretanto o desetilatrazina teve sua degradação influenciada pela adição de matéria orgânica, reduzindo a degradação de 25%, na água não enriquecida para 18% na água com adição de ureia e ácido cítrico. Outro estudo, realizado por Xiang et al. (2016), compararam a degradação de 10 µM de IBP pelo processo Cl/UV em água potável e água ultrapura na presença de 100 µM de cloro em pH 7, e observaram que a degradação decaiu 9,2 % na água potável em relação a água ultrapura aos 20 minutos de tratamento, os autores responsabilizaram a redução devido à presença de bicarbonato e matéria orgânica dissolvida. A Tabela 22 mostra os níveis de consumo do Cl para os experimentos realizados na cloração e Cl/UV na água de torneira, demonstrando que o maior consumo atingiu 30%, em pH 9 na ausência de radiação.

Tabela 22: Consumo de cloro no processo de cloração e Cl/UVC em água da torneira.

Condições	[Cloro] inicial mg.L ⁻¹	Consumido (%)
pH 5	1,4 (sem radiação)	29
	1,4 (com radiação)	20
pH 7	1,4 (sem radiação)	29
	1,4 (com radiação)	20
pH 9	1,4 (sem radiação)	30
	1,4 (com radiação)	20

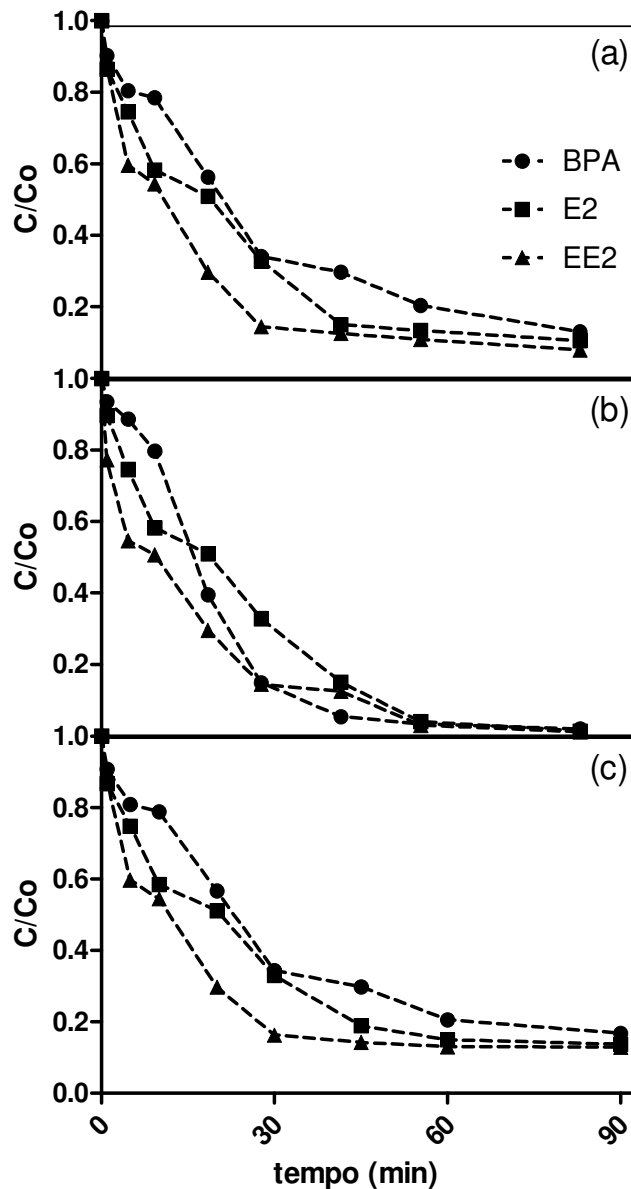
4.3.3. Água residual

Os experimentos com água residual, coletada pós tratamento de lodos ativados, foi realizado com 2 mg.L⁻¹ de Cloro, radiação UVC, variando o valor do pH em 5, 7 e 9, a concentração inicial dos desreguladores endócrinos (BPA, E2 e EE2) foi de 100 µg.L⁻¹. Os gráficos apresentando a evolução das concentrações pelo tempo de tratamento estão apresentadas na Figura 30. O experimento durou 90 minutos e as coletas realizadas a cada 5 minutos.

Os resultados indicam que em 90 minutos de tratamento, apenas em pH 7 o tratamento atingiu valores de remoção abaixo do limite de quantificação, em pH 5 e 9 a remoção foi de

95 e 90%, respectivamente. Devido à complexidade da matriz o tempo de tratamento aumentou de 5 para 90 minutos em relação a água ultrapura adotando as mesmas condições iniciais.

Figura 30: Degradação de BPA, E2 e EE2 por Cl/UVC em água residual de estação de tratamento de esgoto (a) pH 5, (b) pH 7 e (c) pH 9; condições iniciais: $[Cl] = 2\text{mg.L}^{-1}$; $T=25^{\circ}\text{C}$.



Rott et al. (2018) ao analisar a remoção de $0,77 \mu\text{g.L}^{-1}$ de BPA presente na água residual de uma estação de tratamento de águas residuais na Alemanha pelo processo Cl/UV alcançou nível de remoção de 90% ao utilizar 3mg.L^{-1} de Cloro e radiação 1.0kWh/m^3 . O

mesmo trabalho avaliou a remoção utilizando 3 mg.L^{-1} de H_2O_2 e a taxa de remoção diminuiu para 60%. Para mesmas concentrações iniciais de cloro, alterando somente a matriz água ultrapura para água residual, Wang et al (2016) observaram uma diminuição de 30% na cinética da reação do processo Cl/UV na degradação da Carbamazepina. Muitos trabalhos indicam efeitos inibitórios da matriz água residual em tratamentos Cl/UV, considerando a matéria orgânica dissolvida como principal sequestrante de agentes oxidantes e extintores de radicais durante o POA (WANG et al, 2016). Além disso, os materiais dissolvidos na água residual podem causar um efeito de sombreamento, impedindo ou diminuindo a absorção de luz pelo composto-alvo e o agente oxidante (HANSEN E ANDERSEN, 2012).

A caracterização química e microbiológica da água residual antes, durante e depois do tratamento foi realizada somente para o experimento em pH 7 e está apresentada na Tabela 23. O parâmetro nitrogênio total apresentou um aumento nos primeiros 10 minutos de tratamento e posteriormente os valores se mantiveram constantes, os parâmetros COT e CT tiveram redução de 45%, indicando que ocorreu mineralização dos compostos BPA, E2 e EE2, enquanto os parâmetros físico químicos restantes se mantiveram praticamente constantes ao longo do experimento. Os parâmetros microbiológicos *Escherichia Coli* e coliformes totais foram totalmente removidos nos primeiros minutos de análise.

Wang et al (2016) ao estudarem a influência dos parâmetros cloreto (Cl^-) e carbono inorgânico (CI) sobre o processo de degradação Cl/UV não observou efeitos relevantes do Cl^- , devido ao fato do Cl^- reagir com HO^\bullet rapidamente e gerar HOCl que se irá se dissociar em HO^\bullet e Cl^- rapidamente, negligenciando dessa maneira o efeito da adição de Cl^- (JAYSON et al, 1973; KLANING and WOLFF, 1985; VON GUNTEN, 2003). Por outro lado o CI inibiu em 3,8% a velocidade da reação, uma vez que o HCO_3^- , principal componente do CI, pode reagir com o HO^\bullet e cloro em elevadas taxas, gerando o CO_3 que é muito menos reativo com o composto alvo (YANG et al, 2015).

Os estudos de Li et al. (2016) mostraram que o nitrogênio amoniacal reduziu significativamente a eficiência de remoção do E1 e E2 por Cl/UV, as possíveis razões são que o nitrogênio pode transformar rapidamente o cloro em cloramina, cuja capacidade de oxidação é menor do que o cloro, além de diminuir a formação de radicais HO^\bullet , uma vez que a concentração de cloro livre foi reduzida. Ademais, o próprio nitrogênio amoniacal pode ser oxidado em nitrito e nitrato pelo radical HO^\bullet , ocasionando maior consumo do principal agente oxidante responsável pela degradação dos poluentes orgânicos (ZHANG et al, 2015).

Tabela 23: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nos tempos 0, 10, 45 e 90 minutos de tratamento Cl/UV em água residual.

	t = 0	t = 10 min	t = 45 min	t = 90 min	
Parâmetros físico-químicos (mg.L⁻¹)	Carbono orgânico total (COT)	21,31	17,37	13,92	11,83
	Cloreto	53	54	55	57
	Nitrito	0,4	0,3	0,4	0,4
	Nitrato	1,2	1,3	1,2	1,2
	Fosfato	1,2	1,2	1,3	1,3
	Sulfato	21	25,8	32,4	31,1
Parâmetros Microbiológicos (número mais provável)	Coliformes totais	50,5x 10 ⁴	0	0	0
	<i>Escherichia Coli</i>	17,05x 10 ⁴	0	0	0

O consumo de cloro livre após diferentes tratamentos está apresentado na Tabela 24, que demonstra que esse foi parcialmente consumido apesar dos altos valores de degradação atingidas.

Tabela 24: Consumo de Cloro no processo Cl/UV em água residual.

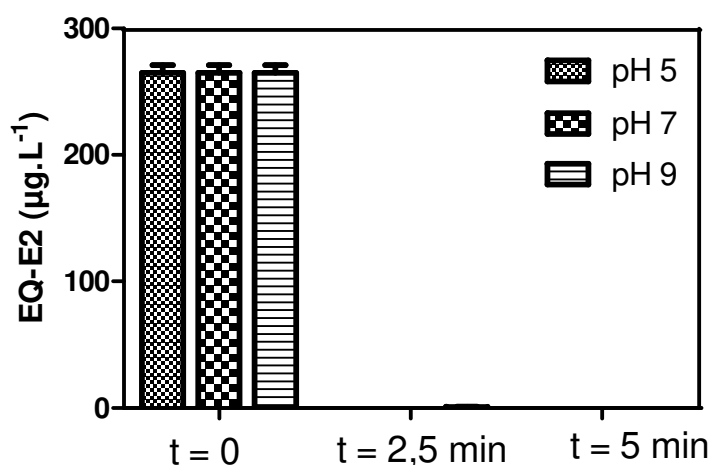
Condições	[Cloro] inicial mg.L ⁻¹	Consumido (%)
pH 5	2	34
pH 7	2	34
pH 9	2	32

4.3.4. Ensaio *in vitro* YES

Embora a redução dos compostos originais seja o objetivo específico, também é necessário examinar o potencial estrogênico das soluções tratadas que podem conter subprodutos com atividade estrogênica. O Anexo 3 mostra as curvas dose-resposta dos experimentos de acordo com cada pH.

O Ensaio *in vitro* YES foi realizado com a amostra obtida na melhor condição de tratamento determinada nesse estudo, isto é, a partir de uma solução $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada composto em água ultrapura na presença de 2mg.L^{-1} de cloro, radiação UVC, variando apenas o pH (5, 7 e 9). As amostras foram coletadas antes do tratamento (tempo 0), durante (2,5 minutos) e após (5 minutos). Os valores de EQ-E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$) obtidos ao longo do tratamento estão expressos na Figura 31.

Figura 31: Valores de EQ-E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em 0, 2,5 e 5 minutos de tratamento Cl/UVC; condições iniciais: $[\text{Cl}] = 2 \text{mg.L}^{-1}$, pH 5, 7 e 9.



Imediatamente antes do experimento (tempo 0) observa-se a atividade estrogênica no valor de $265 \pm 6 \mu\text{g.L}^{-1}$ de EQ-E2. Em 2,5 minutos de experimento somente a amostra em pH 9, embora com considerável redução, ainda apresentou atividade estrogênica no valor de $0,87 \pm 0,12 \mu\text{g.L}^{-1}$. Após 5 minutos de tratamento, todos os compostos foram removidos abaixo do limite de quantificação (Figura 28, item 4.3.1.3) e atividade estrogênica também foi reduzida para valores abaixo do limite de detecção do método, mostrando que o tratamento foi eficiente na remoção dos compostos e não formação de subprodutos estrogênicos.

Wu et al. (2009) sugeriram que a atividade estrogênica dos DEs é reduzida quando passam pelo processo de cloração (sem radiação), isso ocorre porque o anel fenólico é

preferencialmente oxidado pelo cloro, reduzindo conseqüentemente a atividade estrogênica (LEE et al, 2004). Rott (2018) observou redução de 80% da atividade estrogênica total de uma amostra de desreguladores endócrinos BPA e NP pós tratamento Cl/UVC (3 mg.L^{-1} de cloro) em água residual oriunda da Estação de tratamento municipal na Alemanha. Li et al (2016) ao analisarem a redução da atividade estrogênica do E2 ($500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) em água ultrapura e água residual pelo processo Cl/UVC observaram redução da atividade estrogênica de 97,2 e 78,3%, respectivamente em 5 minutos de tratamento com 10 mg.L^{-1} de cloro.

Muitos estudos investigaram os efeitos do tratamento com Cl/UV na remoção de compostos orgânicos e na formação de subprodutos de desinfecção que podem imprimir riscos (ZHANG et al., 2015; WANG et al, 2015; NAM et al, 2015), mas não houve relatos de remoção de estrogênios e formação de subprodutos estrogênicos.

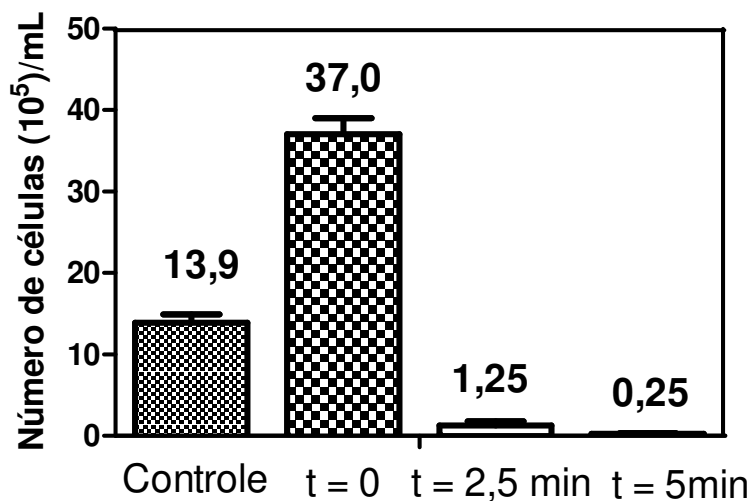
4.3.5. Ensaios Ecotoxicológicos

Os ensaios de toxicidade crônica para fotodegradação Cl/UV foram realizados para melhor condição de tratamento, ou seja, utilizando água ultrapura, concentração 2 mg.L^{-1} de cloro, radiação UVC e pH 7. Os tempos analisados foram: 0; 2,5 e 5 minutos de tratamento.

4.3.5.1. Organismo alga *Raphidocelis subcapitata*

A Figura 32 mostra o crescimento da cultura de células utilizada no ensaio após 72 horas para o controle, tempo 0, 2,5 e 5 minutos de tratamento. O ensaio crônico com o organismo-teste *Raphidocelis subcapitata* para fotodegradação Cl/UV apresentou forte inibição no crescimento de células em ambos os tempos de tratamento analisados quando comparados ao controle. A formação de compostos intermediários, como organoclorados, podem ter ocasionado alta toxicidade observada (SOUISSE et al. 2013), atingindo uma inibição de 91% e 98% do crescimento das células expostas. Na amostra de mistura antes do tratamento foi observado um estímulo do crescimento das células, sendo este fenômeno explicado pela presença do BPA, que funciona como agente estimulante ao crescimento das algas nesta concentração (LI et al. 2017b). No entanto, o estímulo do crescimento não pode ser encarado como um fator positivo, visto que o excesso de algas em ambientes naturais pode ocasionar um desequilíbrio ecológico.

Figura 32: Resultados dos testes de toxicidade crônica com *Raphidocelis subcapitata* durante a fotodegradação Cl/UVC; condições iniciais: [Cl] = 2 mg.L⁻¹, pH 7.



4.3.5.2. Organismo *Ceriodaphnia dubia*

Os ensaios crônicos realizados com organismo-teste *Ceriodaphnia dubia* demonstraram grande sensibilidade dos organismos aos compostos analisados, uma vez que a amostra de mistura antes do tratamento Cl/UV ocasionou mortalidade de 60% dos organismos ao terceiro dia de ensaio e de 100% ao quarto dia. Tal fato pode ser justificado pelo efeito sinérgico dos compostos E2, EE2 e BPA, pois estes mesmos compostos quando analisados isoladamente em outros estudos apresentam valores de EC₅₀ próximos ao utilizado neste trabalho (SPADOTTO et al. 2017; JUKOSKY et al. 2008; JASER et al. 2003). Para as amostras pós tratamento, a mortalidade dos organismos atingiu 100% ao terceiro dia de ensaio, o que pode evidenciar a formação de compostos tóxicos oriundos do cloro durante o tratamento com UV (Manar et al. 2012), como os trihalometanos que são estudados há décadas e estão presentes como subprodutos em muitos tratamentos de água clorada (ROCK, 1977). Desta forma, a análise crônica de reprodução desta espécie não pode ser feita por ter aparecido um efeito agudo no período inicial do ensaio.

4.4. Comparação da eficiência de remoção dos DEs por Fotólise, H₂O₂/UV e Cl/UV

A Tabela 25 apresenta as eficiências de remoção de cada composto (BPA, E2 e EE2) pelos processos oxidativos investigados.

Tabela 25: Eficiências de remoção dos DE pelos processos de fotólise, H₂O₂/UV e Cl/UV.

Matriz	Processo	Condições	BPA (%)	E2 (%)	EE2 (%)	Tempo (min)
Água ultrapura	Fotólise UVA	pH 5	18	28	28	120
	Fotólise UVC	pH 5	70	89	89	
	H ₂ O ₂ /UVA	[H ₂ O ₂] = 3mg.L ⁻¹ ; pH 5	40	47	47	120
		[H ₂ O ₂] = 3mg.L ⁻¹ ; pH 7	46	50	49	
		[H ₂ O ₂] = 3mg.L ⁻¹ ; pH 9	58	60	60	
		[H ₂ O ₂] = 30mg.L ⁻¹ ; pH 5	38	42	42	
		[H ₂ O ₂] = 30mg.L ⁻¹ ; pH 7	40	42	42	
		[H ₂ O ₂] = 30mg.L ⁻¹ ; pH 9	48	50	50	
	H ₂ O ₂ /UVC	[H ₂ O ₂] = 3mg.L ⁻¹ ; pH 5	100	100	100	20
		[H ₂ O ₂] = 3mg.L ⁻¹ ; pH 7	100	100	100	
		[H ₂ O ₂] = 3mg.L ⁻¹ ; pH 9	100	100	100	
		[H ₂ O ₂] = 30mg.L ⁻¹ ; pH 5	94	96	956	
		[H ₂ O ₂] = 30mg.L ⁻¹ ; pH 7	95	96	96	
		[H ₂ O ₂] = 30mg.L ⁻¹ ; pH 9	97	97	97	
	Cloração	[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 5	78	78	78	30
		[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 7	81	81	82	
		[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 9	60	60	60	
		[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 5	81	81	81	
[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 7		97	97	97		
[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 9		68	68	68		
Cl/UVA	[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 5	95	95	95	20	
	[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 7	99	99	99		
	[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 9	94	94	94		
	[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 5	100	100	100		
	[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 7	100	100	100		
	[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 9	100	100	100		

Continuação da Tabela 25: Eficiências de remoção dos DE pelos processos de fotólise, H₂O₂/UV e Cl/UV.

Matriz	Processo	Condições	BPA (%)	E2 (%)	EE2 (%)	Tempo (min)
Água ultrapura	Cl/UV	[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 5	100	100	100	5
		[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 7	100	100	100	
		[Cl] = 1mg.L ⁻¹ ; pH 9	100	100	100	
		[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 5	100	100	100	
		[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 7	100	100	100	
		[Cl] = 2mg.L ⁻¹ ; pH 9	100	100	100	
Água da torneira	Cloração	[Cl] = 1,4 mg.L ⁻¹ ; pH 5	42	42	42	20
		[Cl] = 1,4 mg.L ⁻¹ ; pH 7	46	50	50	
		[Cl] = 1,4 mg.L ⁻¹ ; pH 9	40	40	40	
	Cl/UV	[Cl] = 1,4 mg.L ⁻¹ ; pH 5	100	100	100	10
		[Cl] = 1,4 mg.L ⁻¹ ; pH 7	100	100	100	
		[Cl] = 1,4 mg.L ⁻¹ ; pH 9	98	99	99	
Água residual	H ₂ O ₂ /UV	[H ₂ O ₂] = 3 mg.L ⁻¹ ; pH 5	98	99	99	90
		[H ₂ O ₂] = 3 mg.L ⁻¹ ; pH 7	99	100	100	
		[H ₂ O ₂] = 3 mg.L ⁻¹ ; pH 9	100	100	100	
	Cl/UV	[Cl] = 2 mg.L ⁻¹ ; pH 5	95	95	95	90
		[Cl] = 2 mg.L ⁻¹ ; pH 7	100	100	100	
		[Cl] = 2 mg.L ⁻¹ ; pH 9	90	90	90	

Ao comparar a eficiência na degradação de 100 µM de Ibuprofeno (IBP), em pH 6 pelo processo Cl/UV e H₂O₂/UV, Xiang et al. (2016) relataram que o composto foi 58% removido por Cl/UV, enquanto pelo processo H₂O₂/UV essa remoção foi de aproximadamente 23%, em 5 minutos de tratamento.

Um estudo realizado por Sichel et al. (2011) comparou a eficiência dos processos fotólise, H₂O₂/UV (5mg.L⁻¹ de H₂O₂) e Cl/UV (1 mg.L⁻¹ de Cl₂), em água da torneira, utilizando uma lâmpada de baixa de pressão de 80 W na degradação de EE2, Diflofenaco, carmazepina, benzotriazol, toliltriazol, Sulfametoxazol, desetiltriazina e Iopamidol (1 µg.L⁻¹ de cada composto). O EE2 foi completamente degradado pelo processo Cl/UV, 95% removido pelo processo H₂O₂/UV, enquanto a fotólise não resultou em valores significativos de remoção, os compostos Benzotriazol, toliltriazol e iopamidiol, sulfametoxazol, mostraram degradação semelhante, na ordem Cl/UV > H₂O₂/UV > UV, já desetiltriazina e carbamazepina

foram removido melhor com $H_2O_2/UV > Cl/UV > UV$ finalmente o diflofenaco foi totalmente removido pelos processos H_2O_2/UV e Cl/UV e alcançou 60% de remoção por fotólise.

5. CONCLUSÃO

Os processos oxidativos avançados Cl/UV e H₂O₂/UV foram eficientes na remoção dos desreguladores endócrinos BPA, E2 e EE2 sob diferentes condições experimentais, apresentando diferentes eficiências de remoção.

O processo de fotólise apresentou eficiência reduzida na degradação dos compostos avaliados, apresentando em média 25% de degradação para radiação UVA e 85% para radiação UVC em 120 minutos.

A fotodegradação H₂O₂/UV em água ultrapura obteve melhor remoção na concentração 3 mg.L⁻¹ de H₂O₂, sob radiação UVC e pH 9, atingindo valores de remoção abaixo do limite de detecção para todos DEs em 10 minutos de processo, enquanto os experimentos realizados no escuro não apresentaram remoção significativa. Além disso, o processo H₂O₂/UVC foi capaz de remover, abaixo do LQ, todos os DEs em água residual de tratamento de esgoto em 90 minutos e simultaneamente promoveu a remoção de *E.coli* e coliformes totais em 10 minutos de processo. O ensaio *in vitro* YES revelou que durante o processo H₂O₂/UVC os possíveis subprodutos formados não apresentaram atividade estrogênica. Por outro lado, os ensaios de toxicidade com os organismos-teste *Ceriodaphnia dubia* e *Raphidocelis subcapitata* demonstraram aumento da toxicidade durante o processo H₂O₂/UVC.

A cloração foi capaz de remover os DEs em 30 min em pH7, 2 mg.L⁻¹ de cloro livre em água ultrapura, quando aplicado Cl/UVA para as mesmas condições a degradação ocorreu em 5 minutos e em 2 minutos para Cl/UVC. Na água de torneira esse processo contou com 1,4 mgL⁻¹ e removeu 40% dos desreguladores em 20 minutos quando não foi utilizada radiação e 100% em 5 minutos no processo Cl/UVC. A remoção dos compostos foi mais lenta em água residual de tratamento de esgoto, necessitando de 90 minutos e foi acompanhada da desinfecção de *Escherichia coli* e coliformes totais em apenas 10 minutos de tratamento. O ensaio *in vitro* YES mostrou que os subprodutos formados durante o processo Cl/UVC não apresentaram atividade estrogênica. Entretanto, os testes ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia dubia* e *Raphidocelis subcapitata* demonstraram aumento da toxicidade ao longo do processo Cl/UVC.

Os ensaios ecotoxicológicos foram eficientes para avaliar a toxicidade crônica dos desreguladores e seus subprodutos formados, antes e após os experimentos. O organismo-teste *Raphidocelis subcapitata* apresentou estímulo ao crescimento antes dos tratamentos e inibição do crescimento ao fim dos dois processos. O organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*

apresentou grande sensibilidade aos compostos, e no quarto dia de ensaio nenhum organismo exposto a amostra antes do ensaio havia sobrevivido.

SUGESTÕES FUTURAS

- Analisar os subprodutos formados pelo processo oxidativo avançado Cl/UV e H₂O₂/UV
- Avaliar o comportamento de cada composto separadamente e em dupla para os processos oxidativos avançados Cl/UV e H₂O₂/UV
- Avaliar a toxicidade dos processos através de outros organismo-testes e na matriz água residual

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

ALVES, A.G.; GOMES, L.B.B. **Comparação da eficiência dos processos oxidativos avançados na remoção do hormônio 17 α -Ethinilestradiol**. Monografia em Engenharia Ambiental e Sanitária. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2016.

ALUM, A.; YOON, Y.; WESTEROFF, P.; ABBASZADEGAN, M. **Oxidation of Bisphenol A, 17 α -Estradiol, and 17 β -Ethinyl Estradiol and Byproduct Estrogenicity**. Wiley Periodicals Inc. *Environmental Toxicology*, v. 19, p.257–264, 2004.

ANDREOZZI, R.; N CAPRIO, V.; MAROTTA RADOVNIKOVIC, A. **Ozonation and H₂O₂/UV treatment of clofibrilic in water: a kinetic investigation**. *Journal of Hazardous Materials B* v. 103, p. 233–246, 2003.

ANVISA. Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências. Resolução - RDC Nº 41, de 16 de setembro. Brasil: D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo. 2006.

APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC. 1360 p., 2012.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. de L. et al. **Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura**. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 18, p. 5-9, 2013.

ARAÚJO, R. N. **Degradation of Reactive Blue 19 dye using UV; H₂O₂; UV/H₂O₂; Fenton and photo-Fenton. Application to textile effluents**. Campinas, Civil Engineering College, State University of Campinas, 2002. 135 p. Master's Degree Dissertation.

ARAÚJO, S. A. M. **Desenvolvimento e validação de um método analítico (SPE-HPLC) para determinação de compostos emergentes em águas superficiais**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. **Manual sobre a toxicidade em efluentes industriais**. CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso. Porto Alegre, 40 p., 2011.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. **Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review.** *Environment International*, v. 69, p. 104-119, 2014.

BAKER, V. A. **Endocrine Disrupters —Testing Strategies to Assess Human Hazard.** *Toxicology in Vitro*, v. 15, pp. 413–419, 2001.

BARONTI, C., CURINI, R., D'ASCENZO, G., *et al.* **Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water.** *Environmental Science Technology*, v. 34, pp. 5059-5066, 2000.

BELFROID, A. C., VAN DER HORST, A., VETHAAK, A. D. *et al.* **Analysis and Occurrence of Estrogenic Hormones and their Glucuronides in Surface Water and Waste Water in The Netherlands.** *The Science Total Environment*, v. 225, pp.101-108, 1999.

BERALDO, D. A. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e Nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 79 f. 2012.

BERESFORD, N., ROUTLEDGE, E. J., HARRIS, C. A., *et al.* **Issues Arising When Interpreting Results from an in Vitro Assay for Estrogenic Activity.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 162, pp. 22–33, 2000.

BIANCHETTI, F.J. **Remoção do agente hormonalmente ativoetinilestradiol por pré-oxidação e coagulação: estudo em escala de bancada.** Dissertação de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

BILA, D. M. **Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -estradiol pelo Processo de Ozonização.** Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 281 f. 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências.** *Química Nova*, v. 20, n. 3, p. 651-666, 2007.

BILES, J. E. *et al.* **Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 3541-3544, 1997.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process**, 1st ed., Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 2003.

BKH Consulting Engineers; **Chemical study on Bisphenol A, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat, Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ**. The Netherlands, 2005.

BOLTON, J.R. **Ultraviolet Applications Handbook**. ICC Lifelong Learn Inc, Edmonton, 2010.

BOWLER, R. M.; CONE, J. E. **Segredos em medicina do trabalho**. RTMED, 306 p. 2001.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 18 de março de 2005, p. 58-63.

BRAUN, A. M., OLIVEROS, E. **How to evaluate photochemical methods for water treatment**. Water Sci. Tech., v. 35, n. 4, p. 17-23, 1997.

BRIAN, J. V., HARRIS, C. A., SCHOLZE, M., BACKHAUS, T., BOOY, P., LAMOREE, M., POJANA, G., JONKERS, N., RUNNALLS, T., BONFÀ, A., MARCOMINI, A., SUMPTER, J. P. **Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals**. Environmental Health Perspectives, v. 113, n. 6, pp. 721-728, 2005.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**. 1ª edição. Ed.: Lewis Publishers, 295 p., 2003.

CANESI, L.; BORGHI, C.; CIACCI, C.; FABBRI, R.; LORUSSO, L. C.; VERGANI, L.; MARCOMINI, A.; POIANA, G. **Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland**. Aquatic Toxicology, v. 87, n. 4, p. 272-279, 2008.

CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J. M., *et al.* **Behavior of Pharmaceuticals, Cosmetics and Hormones in a Sewage Treatment Plant**. *Water Research*, v. 38, pp. 2918-2926, 2004.

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N.E. **Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years**. *British Medical Journal*, v. 305, n. 6854, p. 609-613, 1992.

CARGOUËT, M., PERDIZ, D., MOUATASSIM-SOUALI, A., *et al.* **Assessment of River Contamination by Estrogenic Compounds in Paris Area (France)**. *Science of the Total Environment*, v. 324 (1-3), pp. 55-66, 2004.

CAVALCANTE, A.M.; DEZOTTI, M.W.C.; SANT'ANNA JR, G.L. **Técnicas oxidativas para a remoção de matéria orgânica de uma corrente de soda exausta de refinaria de**

petróleo. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 145 p. 2005.

CÉDAT, B. BRAUER, C. Are UV photolysis and UV/H₂O₂ process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. Water Research, v. 100, p. 357-366, 2016.

CHEN, P. J.; LINDEN, K. G.; HINTON, D. E.; KASHIWADA, S.; ROSENFELT, E.J.; KULLMAN, S. W. Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. Chemosphere. v. 65, p. 1094 – 1102, 2006.

CHEN, P. J.; ROSENFELT, E.J.; KULLMAN, S. W.; HINTON, D. E.; LINDEN, K. G.; Biological assessments of a mixture of endocrine disruptors at environmentally relevant concentrations in water following UV/H₂O₂ oxidation. Science direct. v. 376, p. 18 – 26, 2007.

CHOWDHURY, R.R.; CHARPENTIER, P.A.; RAY, M.B. Photodegradation of 17 β -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. Journal Photochemistry Photobiology A: Chemistry. v. 219, p. 67-75, 2011.

CIOCAN, C. M.; CUBERO-LEON, E.; PUINEAN, A. M.; HILL, E. M.; MINIER, C.; OSADA, M.; FENLON, K.; ROTCHELL, J. M. Effects of estrogen exposure in mussels, 94 *Mytilusedulis*, at different stages of gametogenesis. Environmental Pollution, v. 158, n. 9, p. 2977–2984, 2010.

COLBORN, T. Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption. Environ Health Perspect. v110, p. 363–367., 2002.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. Applied microbiology and biotechnology, v. 86, n. 6, p. 1671–1692, 2010.

CONNICK, R.E. The interaction of hydrogen peroxide and hypochlorous acid in acidic solutions containing chloride ion. J. Am. Chem. Soc. v. 69, n. 6, p. 1509 e 1514, 1947.

DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R., and VAN DER KRAAK, G. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. World Health Organization, 2002.

DEBORDE, M.; VON GUNTEN, U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment - Kinetics and mechanisms: A critical review. Water Research. v. 42, p. 13–51, 2008.

DE LIZ, M. V. Estudo da potencialidade da fotocatalise heterogênea (TiO₂ e ZnO) e dos processos fenton para remediação de áreas contamiendas pelos estrogênios estrona, 17 β -

estradiol e 17 α - etinilestradiol. Tese de doutorado em Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., *et al.* **Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening.** Environmental Science Technology. v. 32 (11), pp. 1549-1558, 1998.

DOMÈNECH, X., JARDIM, W. F., LITTER, M. I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In: Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogênea, cap. 1, Rede CYTED, La Plata, 2001.

EPA. Advanced Photochemical Oxidation Processes Handbook. Cincinnati: Environmental Protection Agency, Center for Environmental Research Information, 1998.

FANG, J., FU, Y., SHANG, C. **The roles of reactive species in micropollutant degradation in the UV/free chlorine system.** Environmental Science Technology. v. 48 n. 3, p. 1859 e 1868, 2014.

KONG, X.; JIANG, J.; MA, J.; YANG, Y.; LIU, W.; LIU, Y. **Degradation of atrazine by UV/chlorine: Efficiency, influencing factors, and products.** Water Research. v. 90, p. 15 – 23, 2016.

FENG, Y.; SMITH, D.W.; BOLTON, J.R. **Photolysis of aqueous free chlorine species (HOCl and OCl) with 254 nm ultraviolet light.** J. Environ. Eng. Sci. 6 (3), 277 e 284, 2007.

FERNANDEZ, M. A., LIMAVERDE, A. M., CASTRO, I. B. *et al.* **Ocorrência de Imposex em *Thais Haemastoma*: Possíveis Evidências e Contaminação Ambiental Por Compostos Organotínicos no Rio De Janeiro e em Fortaleza, Brasil.** Caderno de Saúde Pública, v.18 (2), p.463-476, 2002.

FILHO, R. W. R.; VIEIRA, J. C. DE A. E. M. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** Química Nova, v. 29, n. 4, p. 817–822, 2006.

FOLMAR, L. C., HEMMER, M., HEMMER, R., *et al.* **Comparative Estrogenicity of Estradiol, Ethynyl Estradiol and Diethylstilbestrol in an *in vivo*, Male Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*), Vitellogenin Bioassay.** Aquatic Toxicology, v. 49, pp. 77-88, 2000.

FRISCHE, T.; FAUST, M.; MEYER, W.; BACKHAUS, T. **Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES).** Environ. Sci. Pollut, v. 16, 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, p. 463-471, 2011.

FROMME H., KÜCHLER. T., OTTO, T., *et al.* **Occurrence of phthalates and bisphenol A and Fin the environment.** *Water Research*, v. 36, pp. 1429–1438, 2002.

FRONTISTIS, Z., DASKALAKI, V.M., KATSAOUNIS, A., POULIOS, I., MANTZAVINOS, D. **Electrochemical enhancement of solar photocatalysis: degradation of endocrine disruptor bisphenol-A on Ti/TiO₂ films.** *Water Reserarch*. v. 45, p. 2996–300, 2011.

FRONTISTIS, Z.; DROSOU, C., TYROVOLA, K.; MANTZAVINOS, D.; FATTA - KASSINO, D.; VENIERI, D.; XEKOUKOULOTAKIS,N. P. **Experimental and modeling studies of the degra-dation of estrogen hormones in aqueous TiO₂suspensions under simulated solar radiation.** *Ind. Eng. Chem.* v 51, n. 51, p. 16552–16563, 2012.

FRONTISTIS, Z.; KOURAMNOS, M.; MORAITIS, S.; CHATZISYMEON, E.; HAPESHI, E.; FATTA - KASSINO, D.; XEKOUKOULOTAKIS,N. P; MANTZAVINOS, D. **UV and simulated solar photodegradation of 17 α -ethynylestradiol insecondary-treated wastewater by hydrogen peroxide or iron addition.** *Catalysis Today*. V. 252, p. 84 – 92, 2015.

FRYE, C.; BO, E.; CALAMANDREI, G. *et al.* **Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behavior and neuroendocrine systems.** *Journal of Neuroendocrinology*, v. 24, n. 1, p. 144–159, 2012.

GALINDO, C., JACQUES, P., KAL T, A. **Photochemical and photocatalytic degradation of an indigoid dye: a case study of acid blue 7 4 (AB7 4).** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 141 n. 4. p. 7-56, 2001.

GEBHARDT, W.; SCHRODER, H. Fr. **Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation.** *Journal of Chromatography A*, v. 1160, p. 34–43, 2007.

GIBERT, Y.; SASSI-MESSAI, S.; FINI, J.-B.*et al.* **Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis.** *BMC Developmental Biology*, v. 11, p. 4, 2011.

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 (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. **Interferentes endócrinos no ambiente**. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. **A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods**. Advanced in Environment Research, 8: 553 – 597, 2004.

GONSCHOROWSKI GPC. **Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas CG/EM**. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/Universidade de São Paulo, São Paulo, 150 p, 2013.

GRAY, L. E. J., KELCE, W. R., WIESE, T., *et al.* **Endocrine Screening Methods Workshop Report: Detection of Estrogenic and Androgenic Hormonal and Antihormonal Activity for Chemicals That Act Via Receptor or Steroidogenic Enzyme Mechanisms**. *Reproductive Toxicolog.*, v. 11 n. 5. pp. 719-750, 1997.

GUEDE-ALONSO, R.; FERRERA, S. Z.; RODRIGUEZ, S. J. J. **Simultaneous Determination of Hormonal Residues in Treated Waters Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry**. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2013, 8 pages, 2013.

GUILLETTE, L. J. J. *et al.* **Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. General and Comparative Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 32-42, 1996.

HANCI, T. O.; DURSUN, D.; AYDIN, E.; ALATON, I. A.; GIRIT, B.; MITA, L., DIANO, N.; MITA, D. G., GUIDA, M. **S2O8²⁻/UVC and H₂O₂/UVC treatment of Bisphenol A: Assessment of toxicity, estrogenic activity, degradation products and results in real water**. *Chemosphere*, 2014.

HANSEN, K.M.S., ANDERSEN, H.R. **Energy effectiveness of direct UV and UV/H₂O₂ treatment of estrogenic chemicals in biologically treated sewage**. *International Journal Photoenergy*, 2012.

HANSEN, P.-D., DIZER, H., HOCK, B., *et al.* **Vitellogenin - a Biomarker for Endocrine Disruptors**. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 17, pp. 448-451, 1998.

HARTLEY, W. R., THIYAGARAJAH, A., ANDERSEN, M. B., *et al.* **Gonadal Development in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol**. *Marine Environmental Research*, v. 46, pp. 145-148, 1998.

HARTMANN, S., LACORN, M., STEINHART, H. **Natural Occurrence of Steroid**

Hormones in Food. *Food Chemistry*, v. 62 (1), pp. 7-20, 1998.

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, pp. 2117–2126, 2007.

HATEF, A.; ALAVI, S. M. H.; ABDULFATAH, A. et al. **Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 76, n. 2, p. 56–62, 2012.

HEY, G.; GRABIC, R.; LEDIN, ANNA; LA COUR JANSEN, J.; ANDERSEN, H. R. **Oxidation of pharmaceuticals by chlorine dioxide in biologically treated wastewater.** *Chemical Engineering Journal*, v. 185, p. 236-242, 2012.

HU, J., CHENG, S., AIZAWA, T., TERAOKA, Y., KUNIKANE, S. **Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities.** *Environmental Science Technology*. v. 37, p. 5665 e 5670, 2003.

HUANG, C.P.; DONG, C.; TANG, Z. **Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment.** *Waste Management*, v. 13, p. 361- 377, 1993.

HUANG, C. R.; SHU, H. Y. The reaction kinetics decomposition pathways and intermediate formations of phenol in ozonation, UV/O₃ and UV/H₂O₂ processes. *Journal of Hazardous materials*, v. 41, p. 47 – 64, 1995.

HUANG, W.; BIANCO, A.; BRIGANTE, M.; MAILHOT, G.; **UVA-UVB activation of hydrogen peroxide and persulfate for Advanced Oxidation Processes: Efficiency, mechanism and effect of various water constituents.** *Journal of Hazardous Materials*, 2010.

IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, N. J.; EL- DIN, M. G; **Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review**, 2006.

INCE, N. H. **Critical effect of hydrogen peroxide in photochemical dye degradation.** *Water Research*. v. 33, p 1080–1084, 1999.

IRWIN, L. K., GRAY, S., OBERDÖRSTER, E. **Vitellogenin Induction in Painted Turtle, *Chrysemys Picta*, as a Biomarker of Exposure to Environmental Levels of Estradiol.** *Aquatic Toxicology*, v. 55, p. 49-60, 2001.

ISECKE, B. G. **Degradação de etinilestradiol por meio da fotocatalise heterogênea e radiação UV.** Tese de doutorado em Engenharia do Meio Ambiente. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

IUPAC GOLDBOOK. International Union of Pure and Applied Chemistry – GoldBook, 2013. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/C01075.html>>. Acessado em: março de 2018.

JAMES, C. P.; GERMAIN, E. **Micropollutant removal by advanced oxidation of microfiltered secondary effluent for water reuse. Separation and Purification Technology**, v. 127, p. 77-83, 2014.

JASER, W.; SEVERIN, G. F.; JUTTING, U.; JUTTNER, I.; SCHRAMM, K. W.; KETTRUP, A. Effects of 17 α -ethinylestradiol on the reproduction of the cladoceran species *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystallina*. *Environment International*. v. 28, p. 633– 638, 2003.

JAYSON, G., PARSONS, B., SWALLOW, A.J. **Some simple, highly reactive, inorganic chlorine derivatives in aqueous solution. Their formation using pulses of radiation and their role in the mechanism of the Fricke dosimeter.** *Journal Chemical Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases*. v. 69, p. 1597 e 1607, 1973.

JOBLING S.; NOLAN M.; Tyler CR.; BRIGHTY G.; SUMPTER JP; **Widespread sexual disruption in wild fish.** *Environ Sci Technol*, v. 32, p. 2498–2506, 1998.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. **Estimating Steroid O estrogen Inputs Into Activated Sludge Treatment Works and Observations on Their Removal From the Effluent.** *The Science Total Environment*, v. 256, p. 163-173, 2000.

JOHNSON, A. C., SUMPTER, J. P. **Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works.** *Environmental Science Technology*, v. 35, p. 4697-4703, 2001.

JUKOSKY, J. A.; WATZIN, M. C.; LEITER, J. C. **Elevated Concentrations of Ethinylestradiol, 17 β -Estradiol and Medroxyprogesterone have Little Effect on Reproduction and Survival of *Ceriodaphnia dubia*.** *Bull Environ Contam Toxicol*. v. 81, p. 230–235, 2008.

KANG, I. J., YOKOTA, H., OSHIMA, Y., *et al.* **Effect of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*).** *Chemosphere*, v. 47, p. 71-80, 2002.

KARCI, A.; ALATON, I.; BEKBOLET, I. A.; OZHAN, G.; ALPERTUNGA, B. **H₂O₂/UV-C and Photo-Fenton treatment of a nonylphenol polyethoxylate in synthetic freshwater: Follow-up of degradation products, acute toxicity and genotoxicity.** *Chemical Engineering Journal*. v. 241, p. 43 – 51, 2014.

KIDD, K. A. *et al.* **Human and wildlife exposures to EDC's.** Chapter 3. *State of the science of endocrine disrupting chemicals*, p. 189–250, 2012.

KLEYWEGT, S. **Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada - Occurrence and treatment efficiency.** *Science of the Total Environment*, v. 409, p.1481, 2011.

KLANING, U.K., WOLFF, T. **Laser flash photolysis of HClO, ClO⁻, HBrO, and BrO⁻ in aqueous solution. Reactions of Cl⁻ and Br⁻ Atoms.** *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chemical.* v. 89, n. 3, p. 243 e 245, 1985.

KOIFMAN, S. & PAUMGARTTEN, F. J. R., **O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública.** *Cad. Saúde Pública*, v. 18, p. 354-355, 2002.

KOLLER, L. R. *Ultraviolet radiation.* Londres: John Wiley & Son, 1952.

KOMMINENI, S. et al. **Advanced Oxidation Processes.** In: MELIN, G. **Treatment Technologies for Removal of Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) from Drinking Water: Air Stripping, Advanced Oxidation Processes, Granular Activated Carbon and Synthetic Resins Adsorbents.** 2. ed. California: National Water Research Institute, Cap. 3, p. 109-199, 2000.

KONDRAKOV, A.O.; IGNATEV, A. N.; FRIMME, F.H.; BRASE, S.; HORN, H.; REVELSKY, A.I. **Formation of genotoxic quinones during bisphenol A degradation by TiO₂ photocatalysis and UV photolysis: A comparative study.** *Applied Catalysis B: Environmental*, v.160- 161, p.106 – 114, 2014.

KONG, X.; JIANG, J.; MA, J.; YANG, Y.; LIU, W.; LIU, Y. **Degradation of atrazine by UV/chlorine: Efficiency, influencing factors, and products.** *Water Research.* v. 90, p. 15 – 23, 2016.

KOUTANTOU, V.; KOSTADIMA, M; CHATZISYMEON, E.; FRONTISTIS, Z.; BINAS, V.; VENIERI, D.; MANTZAVINOS, D. **Solar photocatalytic decomposition of estrogens over immo-bilized zinc oxide.** *Catal. Today*, v. 209, p. 66–73, 2013.

KNORR, S., BRAUNBECK, T. **Decline in Reproductive Success, Sex Reversal, and Developmental Alterations in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) After Continuous Exposure to Octylphenol.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 51, pp. 187-196, 2002.

KÖRNER, O. et al. **Water temperature and concomitant waterborne ethinylestradiol exposure affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta*).** *Aquatic Toxicology*, v. 90, p. 188-196, 2008.

KUO, H.-W., DIN, W.-D. **Trace Determination of Bisphenol A and Phytoestrogens in Infant Formula Powders by Gas Chromatography–Mass Spectrometry.** *Journal of*

Chromatography A, v. 1027, pp. 67–74, 2004.

KUSTER, M.; ALDA, M. J. L.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; ALONSO, J. M.; BARCELÓ, D. **Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin.** *Journal of Hydrology*, v. 358, p. 112–123, 2008.

LEANDRO, F. Z. *Bisfenol a: validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara.* Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 94 f. 2006.

LEAHY, J. G.; SHREVE, G. S. **The effect of organic carbon on the sequential reductive dehalogenation of tetrachloroethylene in landfill leachates.** *Water Research*, v. 34, n. 8, p. 2390-2396, 2000.

LEE, B.-C.; KAMATA, M.; AKATSUKA, Y.; TAKEDA, M.; OHNO, K.; KAMEI, T.; MAGARA, Y. **Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals.** *Water Research*. v. 38, p. 733–739, 2004.

LEE, Y.; VON GUNTEN, U. **Oxidative transformation of micropollutants during municipal wastewater treatment: Comparison of kinetic aspects of selective (chlorine, chlorine dioxide, ferrate VI, and ozone) and non-selective oxidants (hydroxyl radical).** *Water Research*. v. 44, p. 555–566, 2010.

LEECH, D.M., SNYDER, M.T., WETZEL, R.G. **Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 b-estradiol in water.** *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 2087-2092, 2009.

LI, C.; DONG, F.; CRITTENDEN, J. C.; LUO, F.; CHEN, X.; ZHAO, T. **Kinetics and mechanism of 17b-estradiol chlorination in a pilot-scale water distribution systems.** *Chemosphere*. v. 178, p. 73 – 79, 2017a.

LI, D.; BI, R.; CHEN, H; UM, L.; ZHANG, L.; CHEN, Q.; XIE, H.; LUO, Y.; XIE, L. **The acute toxicity of bisphenol A and lignin-derived bisphenol in algae, daphnids, and Japanese medaka.** *Environmental Sci Pollut Res*. v.24, p. 23872–23879, 2017b.

LI, M.; XU, B.; LIUNGAI, Z.; HU, H. Y.; CHEN, C.; QIAO, J.; LU, Y. **The removal of estrogenic activity with UV/chlorine technology and identification of novel estrogenic disinfection by-products.** *Journal of Hazardous Materials*. v. 307, p. 119-126, 2016.

LI PUMA, G.; PUDDU, V.; TSANG, H.K.; GORA, A.; TOEPFER, B. **Photocatalyticoxidation of multicomponent mixtures of estrogens (estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), 17 α - ethynylestradiol (EE2) and estriol (E3)) under UVA and UVC radiation: Photon absorption, quantum yields and rate constants independent of photon absorption.** *Applied Catalysis B: Environmental*, v.99, p. 388–397, 2010.

LI, Z., DVORAK, B., LI, X. **Removing 17 β -estradiol from drinking water in a biologically active carbon (BAC) reactor modified from a granular activated carbon (GAC) reactor.** *Water Research*. v. 46, p. 2828 e 2836, 2012.

LIMA, D. L. D.; SCHNEIDER, R. J.; ESTEVES, V. I. **Sorption behavior of EE2 on soils subjected to different long-term organic amendments.** *Science of the Total Environment*, v. 423, p. 120-124, 2012.

LINDEN, K. G.; ROSENFELDT, E. J.; KULLMAN, W. **UV/H₂O₂ degradation of endocrine-disrupting chemicals in water evaluated via toxicity assays.** *Water Science & Technology* v. 55, n. 12 p 313–319, 2007.

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

LIU, Z. H.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. **Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review.** *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 731-748, 2009.

LIZ, M. V.; NAGATA, N.; ZAMORA, P. P. **Considerações sobre o preparo de amostras contendo micropoluentes estrogênicos.** *Química Nova*. v. 35, n.6, 2012.

LOOS, R.; LOCORO, G.; CONTINI, S. **Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis.** *Water Research*, v. 44, p. 2325-2335, 2010.

LOPEZ DE ALDA, M. J., BARCELO, D. **Determination of Steroid Sex Hormones and Related Synthetic Compounds Considered as Endocrine Disrupters in Water By Fully Automated on-Line Solid-Phase Extraction–Liquid Chromatography–Diode Array Detection.** *Journal Chromatography A*, v. 911, pp. 203-210, 2001.

LÖWENBERG, J.; ZENKER, A.; BAGGENSTOS, M. **Comparison of two PAC/UF processes for the removal of micropollutants from wastewater treatment plant effluent: Process performance and removal efficiency.** *Water Research*, v. 56, p. 26-36, 2014.

LUO, Y. et al. **A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment.** Science of the Total Environment, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MA, X.; ZHANG, C.; DENG, J. et al. **Simultaneous Degradation of Estrone, 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinyl Estradiol in an Aqueous UV/H₂O₂ System.** International Journal of Environmental. v. 12, p. 12016-12029, 2015.

MARKEY, C. M., RUBIN, B., S., SOTO, A. M., *et al.* **Endocrine Disruptors: From Wingspread to Environmental Developmental Biology.** Journal Steroids Biochemistry & Molecular Biology, v. 1802, p. 1-10, 2003.

MATTHEW, B.M., ANASTASIO, C. **A chemical probe technique for the determination of reactive halogen species in aqueous solution: part 1-bromide solutions.** Atmos. Chem. Phys. v.6, n.9, p. 2423 e 2437, 2006.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. **Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados.** Química nova. v. 32, n. 1, 2009.

MILLIGAN, SR; BALASUBRAMANIAN, AV. **Relative potency xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay.** Environ Health Perspect. v. 106, p. 23-6, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011.

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, p. 97-112, 2000.

MONTAGNER, C.C. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), Brasil, 126 p. 2007.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. **Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil).**Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 22, p. 1452-1462, 2011.

MONCAUT, N., NOSTRO, F. L., MAGGESE, M C. **Vitellogenin Detection in Surface Mucus of the South American Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) Induced by Estradiol-17 β . Effects on Liver and Gonads.** *Aquatic Toxicology*, v. 63, pp. 127-137, 2003.

MORAES, L.A.R e AZEVEDO, E.B. **Aplicação da fotocatalise heterogênea para a degradação de corantes de um indústria de cosméticos.** Dissertação (Mestrado em

Química Analítica), Universidade de São Paulo, Instituto de Química- IQ, 62 p. 2010.

MORAIS, J. L. de. **Estudo da potencialidade de processos oxidativos avançados, isolados e integrados com processos biológicos tradicionais, para tratamento de chorume de aterro sanitário.** 207f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2005.

MORRIS, J.C. **The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35°.** The Journal of Physical Chemistry. v. 70, n. 12, p. 3798–3805, 1966.

MURUGANANDHAM, M.; SWAMINATHAN, M. **Photochemical oxidation of reactive azo dye with UV/H₂O₂ process.** Dyes Pigments, v. 62, p. 269–275, 2004.

NAM, S. W.; YOO, Y.; CHOI, D. J.; ZOH, K. D. **Degradation characteristics of metoprolol during UV/chlorination reaction and a factorial design optimization.** J. Hazard. Mater. v. 285, p. 453–463, 2015.

NBR 12648. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de Ensaio com algas (*Chlorophyceae*).** 3ª edição, 2018.

NBR 13373. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp* (*Crustacea, Cladocera, crustacea*).** 2017.

NEAMTU, M.; FRIMMEL, F. **Degradation of endocrine disrupting bisphenol A by 254 nm irradiation in different water matrices and effect on yeast cells.** Water research, v. 40, p. 3745– 3750, 2006.

NOWELL, L.H., HOINGE, J. **Photolysis of aqueous chlorine at sunlight and ultraviolet wavelengths-II. Hydroxyl radical production.** Water Research. v. 26, n. 5, p. 599 e 605, 1992.

NOGUEIRA, R; OLIVEIRA, M; PATERLINI, W. **Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate.** Elsevier BV, v. 66, n. 1, p.86-91, 2005.

NOPPE, H.; LE BIZEC, B.; VERHEYDEN, K.; DE BRABANDER, H. F. **Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices.** Analytica Chimica Acta, v. 611, p. 1-16, 2008.

NRMCC, Environment Protection and Heritage Council, National Health and Medical Research Council & Natural Resource Management Ministerial Council. Australian Guidelines for Water Recycling: Augmentation of Drinking Water Supplies. Biotext Pty Ltd.,

Canberra, 2008.

NRMMC, National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council. Australian Drinking Water Guidelines (2011) - updated 2015, Commonwealth of Australia, Canberra, 2015.

OECD. **Detailed Review Paper - Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals.** Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, ENV/JM/MONO, 2002.

OLMEZ-HANCI, T.; DURSUN, D. **S2O8-2/UV-C and H2O2/UV-C treatment of Bisphenol A: Assessment of toxicity, estrogenic activity, degradation products and results in real water.** *Chemosphere*, v. 119, p. S115-S123, 2015.

PANTER, G. H., THOMPSON, R. S., SUMPTER, J. P. **Adverse Reproductive Effects in Male Fathead Minnows (*Pimephales Promelas*) Exposed to Environmentally Relevant Concentrations of the Natural Oestrogens, Oestradiol and Oestrone.** *Aquatic Toxicology*, v. 42, p. 243-253, 1998.

PANTER, G. H., THOMPSON, R. S., SUMPTER, J. P. **Intermittent Exposure of Fish to Estradiol.** *Environmental Science Technology*, v. 34, n. 13, p. 2756-2760, 2000.

PAWLOWSKI, S.; VAN ARLE, R.; TYLER, C. R.; BRAUNBECK, T. **Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.57, n.3, p.330-345, 2004.

PEREIRA, A. S. G.; SANTOS, S. F. M.; MOREIRA, E. D. T. **Bisfenol A: Detecção em água potável e eficiência na remoção utilizando filtros comerciais.** XX Congresso de Engenharia Química-COBEQ, 2014.

PEREIRA, R. O.; CARMINATO, V.M.; VIEIRA, E. M.; DANIEL, L. A. **Degradação parcial de 17 β -estradiol por cloração aplicada ao tratamento da água.** *Revista Engenharia sanitária e ambiental*. v. 18, n.3, p. 215-222, 2013.

PESSOA, G. P. et al. **Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos.** *Química Nova*. v 35, n 5, p. 968-973, 2012.

POLO, M. S.; DAIEM, M. M. A.; PEREZ, R. O.; UTRILLA, J. R. **Comparative study of the photodegradation of bisphenol A by HO \bullet , SO $_4^{\bullet-}$ and CO $_3^{\bullet-}$ /HCO $_3^{\bullet}$ radicals in aqueous phase.** *Science of the Total Environment*. v. 463, p. 423 – 431, 2013.

QUEIROZ, F.B.; BRANDT, E.M.F.; AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L.; AFONSO, R.J.C.F. **Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times.** *Water Science & Technology*, v.6612, p. 2562-2569, 2012.

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, Instituto de Química, Universidade Federal de Campinas. Campinas, 2007.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

REYS, L. L. **Tóxicos Ambientais Desreguladores do Sistema Endócrino.** *RFML Série III*; v. 6 (4), pp. 213-225, 2001.

ROBINSON, C. D., BROWN, E., CRAF, J. A., DAVIES, I. M., et al. **Effects of Sewage Effluent and Ethynyl Oestradiol Upon Molecular Markers of Oestrogenic Exposure, Maturation and Reproductive Success in the Sand Goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas).** *Aquatic Toxicology*, v. 62, n 2, pp. 119-134, 2002.

ROCHESTER, J. R. **Bisphenol A and human health: A review of the literature.** *Reproductive Toxicology*, v. 42, p. 132-155, 2013.

ROCK, J.J. **Chlorination of fulvic acids in natural waters.** *Environmental Science and Technology*. v. 11, p. 478 e 482. 1977.

RODGER-GRAY, T.P., JOBLING, S., KELLY, C., et al. **Exposure of Juvenile Roach (*Rutilus rutilus*) to Treated Sewage Effluent Induces Dose-Dependent and Persistent Disruption in Gonadal Duct Development.** *Environmental Science Technology*, v. 35 (3), pp. 462-470, 2001.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. **Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1045, p. 85-92, 2004.

ROSE, J., HOLBECH, H., LINDHOLST, C., NORUM, U., et al. **Vitellogenin Induction by 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinylestradiol in Male Zebrafish (*Danio rerio*).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 131, pp. 531–539, 2002.

ROSENFELDT, E. J. et al. **Destruction of estrogenic activity in water using UV advanced oxidation.** *Science of the Total Environment*, v. 377, p. 105-113, 2007.

ROSENFELT, E., BOAL, A.K., SPRINGER, J., STANFORD, B., RIVERA, S., KASHINKUNTI, R.D.; METZ, D.H. **Comparison of UV-mediated advanced oxidation.** *J. Am. Water Works Assoc.* 105 n. 7. p. 29 e 33, 2013.

ROTT, E.; KUCH, B.; LANGE, C.; RICHTER, P.; KUGELE, A.; MINKE, R. **Removal of Emerging Contaminants and Estrogenic Activity from Wastewater Treatment Plant Effluent with UV/Chlorine and UV/H₂O₂ Advanced Oxidation Treatment at Pilot Scale.** *International Journal of Environmental Research and Public Health.* v. 15, p. 935, 2018.

ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAN, D., DESBROW, C. *et al.* **Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach.** *Environmental Science Technology*, v. 32 (11), pp. 1559-1565, 1998.

ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. **Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15 (3), pp. 241-248, 1996.

RUBIN, B. S. **Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects.** *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, p. 27–34, 2011.

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

SANTOS, F. S. **Estudo da fotodegradação do Bisfenol A em solução aquosa via fotólise direta.** Dissertação de mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

SCHMID, T., GONZALEZ-VALERO, J., RUFLI, H., *et al.* **Determination of Vitellogenin Kinetics in Male Fathead Minnows (*Pimephales promelas*).** *Toxicology. Letters*, v. 131, pp. 65-74, 2002.

SHARMA, J.; MISHRA, I. M. **Degradation and mineralization of Bisphenol A (BPA) in aqueous solution using advanced oxidation processes: UV/H₂O₂ and UV/S₂O₈-2 oxidation systems.** *Journal of Environmental Management*, v. 156, p. 266-275, 2015.

SHEN, Y. S.; WANG, D. K. **Development of photoreactor design equation for the treatment of dye wastewater by UV/H₂O₂ process.** *Journal of Hazardous Materials*, v. B89, p. 267-277, 2002.

SHIODA, T., WAKABAYASHI, M. **Effect of Certain Chemicals on The Reproduction of Medaka (*Oryzias latipes*).** *Chemosphere*, v. 40, pp. 239-243, 2000.

SHIN, H.-S.; OH, J.-A.; SHIN, S.-K. **Sensitive Determination of Natural and Synthetic Steroidal Hormones of a Free and Conjugated Form in Surface Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.** *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 32, n. 3,

p. 809–814, 2011.

SICHEL, C., GARCIA, C., ANDRE, K. **Feasibility studies: UV/chlorine advanced oxidation treatment for the removal of emerging contaminants.** *Water Research*. 45 p. 6371 e 6380, 2011.

SILVA, C.P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. **Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review.** *Environ. Pollut.* v. 165, p. 38–58, 2012.

SIRTORI, C.; AGUERA, A.; GERNJAK, W.; MALATO, S.; **Effect of water–matrix composition on Trimethoprim solar photodegradation kinetics and pathways.** *Water Res.* v. 44, p. 2735–2744, 2010.

SLOKAR, Y. M., LE MARECHAL, M. **Methods of Decoloration of Textile Wastewaters.** *Dyes and Pigments*, 37, 335-356, 1998.

SOLÉ, M., RALDUA, D., BARCELÓ, D., PORTE, C. **Long-term Exposure Effects in Vitellogenin, Sex Hormones, and Biotransformation Enzymes in Female Carp in Relation to a Sewage Treatment Works.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, pp. 373-380, 2003.

SOTO, A. M., SONNENSCHNEIN, C., CHUNG, K. L., *et al.* **The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants.** *Environmental Health Perspectives*, v.103, pp. 113-122, 1995.

SOUISSI, Y.; BOUCHONNET, S.; BOURCIER, S.; KUSK, K. O.; SABLIER, M.; ANDERSEN, H. R. Identification and ecotoxicity of degradation products of chloroacetamide herbicides from UV-treatment of water. *Science of the Total Environment*. v. 458-460, p. 527–534, 2013.

SPADOTO, M.; SUETTI, A. P. E.; GALINARO, C. A.; PINTO, T. S.; POMPEI, C. M. E.; BOTTA, C. M. R.; VIEIRA, E. M. **Ecotoxicological effects of bisphenol A and nonylphenol on the freshwater cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*.** *Drug and Chemical Toxicology*, 2017.

STAPLES, C. A. *et al.* **A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A.** *Chemosphere*, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.

STUMPE, B., MARSCHNER, B. **Factors controlling the biodegradation of 17 β -estradiol, estrone and 17 α -ethinylestradiol in different natural soils.** *Chemosphere*, v. 74, p. 556-562, 2009.

SUMPTER, J. P., JOBLING, S. **Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment.** *Environmental Health Perspect*, v. 103 (Suppl

7), pp.173-178, 1995.

TEIXEIRA, C.P.A.B. e JARDIM, W.F. **Processos Oxidativos Avançados. Conceitos Teóricos.** Caderno Temático, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química-IQ. Laboratório de Química Ambiental-LQA, v.3, 2004.

TERNES, T. A., STUMPF, M., MUELLER, J. *et al.* **Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.** *The Science Total Environment*, v. 225 (1-2), p. 81-90, 1999a.

TERNES, T. A., KRECKEL, P., MUELLER, J. **Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants. Aerobic batch experiments with activated sludge.** *The Science Total Environment*, v. 225 (1-2), p. 91-99, 1999b.

TESKE, S. S.; ARNOLD, R. G. **Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment.** *Rev Environ Sci Biotechnol*, v. 7, n. 2, p. 107-124, 2008.

USEPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis, report N°.** EPA/630/R-96/012, Washington D. C., 1997.

USEPA. **Microbiological methods for monitoring the environment: water and waste—**EPA/600/878–017. Cincinnati, 1978.

VAN DEN BELT, K., VERHEYEN, R., WITTERS, H. **Comparison of Vitellogenin Responses in Zebrafish and Rainbow Trout Following Exposure to Environmental Estrogens.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, pp. 271–281, 2003.

VERBINNEM, R.T.; NUNES, G. S. e VIEIRA, E. N. **Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE/DAD.** *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 9, 1837-1842, 2010.

VOGNA, D.; MAROTTA, R.; NAPOLITANO, A.; ANDREOZZI, R.; D'ISCHIA, M. **Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenaco with UV/H₂O₂ and ozone.** *Water Research*. v. 38, p. 414 – 422, 2004.

VON GUNTEN, U. **Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and byproduct formation in presence of bromide, iodide or chlorine.** *Water Reserch*. v. 37, n. 7, 1469 e 1487, 2003.

WANG, Y.R., CHU, W. **Photo-assisted degradation of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid by Fe (II)-catalyzed activation of Oxone process: the role of UV irradiation, reaction mechanism and mineralization.** Appl. Catal. B Environ. 123, 151 e 161, 2012.

WANG, Z., LIN, Y.-L., XU, B., XIA, S.-J., ZHANG, T.-Y., GAO, N.-Y. **Degradation of iohexol by UV/chlorine process and formation of iodinated trihalomethanes during post-chlorination.** Chem. Eng. J. 283, 1090 e 1096, 2016.

WANG, D.; BOLTON, J. R.; ANDREWS, S. A.; HOLMANN, R. **Formation of disinfectionby-products in the ultraviolet/chlorine advanced oxidation process.** Sci. Total Environ. v. 518 p. 49–57, 2015.

WANG, W.L.; WU, Q. Y.; HUANG, N., WANG, T.; HU, H. Y. **Synergistic effect between UV and chlorine (UV/chlorine) on the degradation of carbamazepine: Influence factors and radical species.** Water Research. v. 98, p. 190- 198, 2016.

WATTS, M. J.; LINDEN, K.G. **Chlorine photolysis and subsequent OH radical production during UV treatment of chlorinated water.** Water Res. 41 (13), 2871 e 2878, 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors: an assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme.** 2002.

WU, Q.-Y.; HU, H.-Y.; ZHAO, X.; SUN, Y.-X. **Effect of Chlorination on the Estrogenic/Antiestrogenic Activities of Biologically Treated Wastewater.** Environmental Science Technology. v. 43, p. 4940–4945, 2009.

XEKOUKOULOTAKIS, N. P.; DROSOU, C.; BREBOU,C.; CHATZISYMEON, E.; HAPESHI, E.; FATTA-KASSINOS, D.; MANTZAVINOS, D. **Kinetics of UV-A/TiO₂ photocatalytic degradation and mineralization of the antibiotic sulfamethoxazole in aqueous matrices.** Catal. Today, v.161, p. 163–168, 2011.

XIANG, Y., FANG, J., SHANG, C. **Kinetics and pathways of ibuprofen degradation by the UV/chlorine advanced oxidation process.** Water Research. v. 90, p. 301e308, 2016.

XIN Y., JIANLIANG S.; WENJIE, F.; CHII S., YIN L.; YIWEI C., WENHUI G., JINGYUN F. **PPCP degradation by UV/chlorine treatment and its impact on DBP formation potential in real Waters.** Water Research 98 309 e 318, 2016.

YANG, Y., JIANG, J., LU, X., MA, J., LIU, Y. **Production of sulfate radical and hydroxyl**

radical by reaction of ozone with peroxymonosulfate: a novel advanced oxidation process. *Environmental Science Technology*. v.49, n. 12, p. 7330 e 7339, 2015.

YANG, J. et al. **Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China.** *Chemosphere*, v. 107, p. 439-446, 2014.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. **Occurrence and fate of hormone steroids in the environment.** *Environment International*, v. 28, n. 6, p. 545-551, 2002.

YING, G. G. **Analysis of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals and personal care products in water.** *Handbook of water analysis*. p. 693-727, 2007.

YUE, P. L.; LEGRINI, O. **Photochemical degradation of organics in water.** *Water Pollut. Research J. Can.* v. 27, p 123–137, 1992.

ZACHARAKIS, A.; CHATZISMEON, E.; BINAS, V.; FRONTISTIS, Z.; VENIERI, D.; MANTZAVI-NOS, D.; **Solar photocatalytic degradation of bisphenol A on immobilized ZnO or TiO₂.** *Int. J. Photoenergy*. p. 1 – 9, 2013.

ZACHAREWSKI, T. **In Vitro Bioassays for Assessing Estrogenic Substances.** *Environmental Science Technology*. v. 31 n. 3, pp. 613-623, 1997.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E., **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações.** RIMA, São Carlos. p 478, 2008.

ZEHAVI, D.; RABANI, J. **Oxidation of aqueous bromide ions by hydroxyl radicals. Pulse radiolytic investigation.** *J. Phys. Chem.* v.76, n.3, p. 312 e 319, 1972.

ZHANG, X.; LI, W.; BLATCHLEY, E. R.; WANG, X.; REN, P. **UV/chlorine process for ammonia removal and disinfection by-product reduction: comparison with chlorination.** *Water Res.* v. 68, p. 804–811, 2015.

ZHANG, Z.; FENG, Y.; LIU, Y.; SUN, Q.; GAO, P.; NANQI, R. **Kinetic degradation model and estrogenicity changes of EE2 (17 - ethinylestradiol) in aqueous solution by UV and UV/H₂O₂ technology.** *Journal of Hazardous Materials*. v. 181, p. 1127-1133, 2010.

ZHAO, Q., SHANG, C., ZHANG, X., DING, G., YANG, X. **Formation of halogenated organic byproducts during medium-pressure UV and chlorine co-exposure of model compounds, NOM and bromide.** *Water Reserach* 45. n19. p 6545 e 6554, 2011.

ZHOU, G.; FANG, H. H. P. **Co – degradation of phenol and M-cresol in a UASB reactor.** *Bioresource Technology*. v. 61, n.1, p. 47 – 52, 1997.

ZILLI, S. C. **Detecção e degradação fotoquímica de acrilamida residual em água para consumo humano.** Dissertação (Mestrado em Engenharia civil) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 62 f. 2015.

ANEXO I - Protocolo de preparação das soluções do ensaio *in vitro* YES

Preparação da solução de Meio Mínimo

A solução de meio mínimo foi preparada misturando-se os seguintes reagentes em 1 L de água ultrapura:

- 13,61 g de KH_2PO_4
- 1,98g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 4,2g de KOH peletes
- 0,2g de MgSO_4
- 1 mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40 mg/50 mL de água ultrapura)
- 50 mg de L-leucina
- 50 mg de L-histidina
- 50 mg de adenina
- 20 mg de L-arginina-HCl
- 20 mg de L-metionina
- 30 mg de L-tirosina
- 30 mg de L-isoleucina
- 30 mg de L-lisina-HCl
- 25 mg de L-fenilalanina
- 100 mg de L-ácido glutâmico
- 150 mg de L-valina e
- 375 mg L-serina

Preparação da solução de Vitamina

A solução de vitamina foi preparada pela adição dos seguintes reagentes em 180 mL de água:

- 8 mg de tiamina
- 8 mg de piridoxina
- 8 mg de pantetonato de cálcio
- 40 mg de inositol e
- 20 mL de solução de biotina (2mg/100 mL água)

Preparação da solução de Glicose

A solução de glicose foi preparada a 20% m/v (20 g de glicose diluídos em 100 mL de água ultrapura).

Preparação da solução de Ácido L-aspártico

A solução de ácido L-aspártico foi preparada na concentração de 4 mg.mL⁻¹, com água ultrapura.

Preparação da solução de L-Treonina

A solução foi preparada na concentração de 24 mg/mL (600 mg/25 mL) de L-treonina em água ultrapura.

Preparação da solução de Sulfato de Cobre (II)

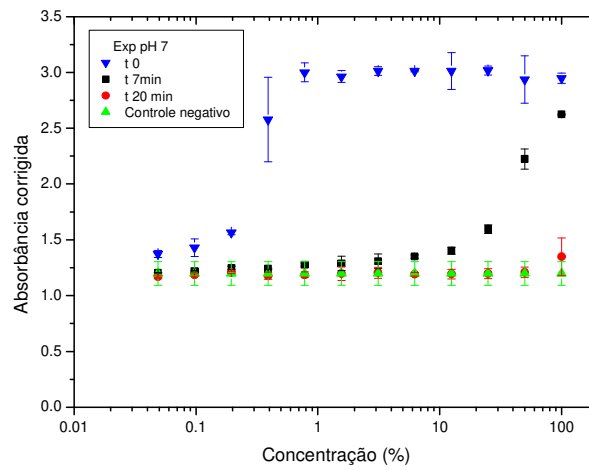
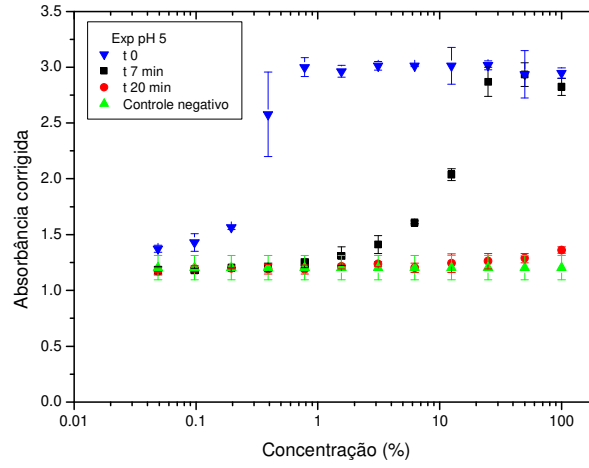
Uma solução de 20mM (0,5 g/100 mL) de sulfato de cobre (II) foi preparada com água ultrapura.

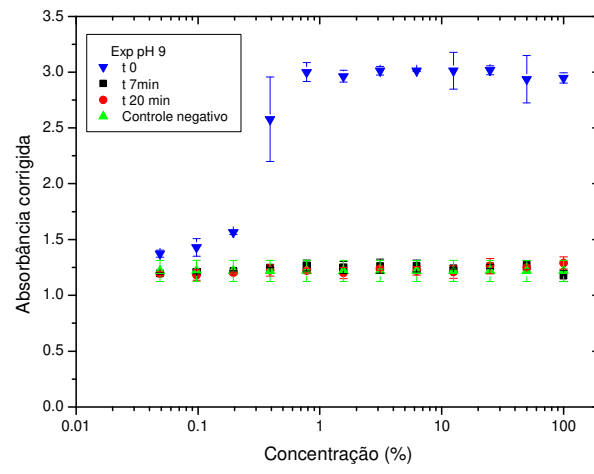
Preparação da solução de CPRG

A solução de CPRG foi ser preparada na concentração de 10 mg/mL com água ultrapura e armazenada a 4°C em frascos de vidro esterilizados e cobertos para evitar a passagem da luz.

Preparação do meio de cultivo

O meio de cultivo é preparado no dia do ensaio, a partir da mistura de 5 mL de glicose, 1,25 mL de ácido L-aspártico, 0,5 mL de vitamina, 0,4 mL de L-treonina, 125 µL de sulfato de cobre e 45 mL de meio mínimo.

ANEXO 2: Curvas dose-resposta das amostras de tratamento H₂O₂/UV



ANEXO 3: Curvas dose-resposta das amostras de tratamento Cl/UV

