UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

RENATA DE OLIVEIRA PEREIRA

**Formação de subprodutos do estrona e 17β -estradiol na oxidação
utilizando cloro e o ozônio em água**

SÃO CARLOS

2011

RENATA DE OLIVEIRA PEREIRA

**Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação
utilizando cloro e o ozônio em água**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos da Universidade de São Paulo, co-
mo parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências (Engenharia Hidráulica
e Saneamento)

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Daniel

São Carlos
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

P436f Pereira, Renata de Oliveira
Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água / Renata de Oliveira Pereira ; orientador Luiz Antônio Daniel. -- São Carlos, 2011.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Engenharia Hidráulica e Saneamento) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.

1. Degradação. 2. Desinfecção. 3. Hormônios.
4. Oxidação. 5. Subprodutos. 6. Tratamento de água.
I. Título.

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 18138 - 5988130 - 1 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Renata de Oliveira Pereira no Programa: Engenharia Hidráulica e Saneamento, do(a) Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Aos 18 dias do mês de fevereiro de 2011, no(a) Depto de Hidráulica e Saneamen realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Renata de Oliveira Pereira, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Formação de subprodutos do Estrona e 17 β -Estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Luiz Antonio Daniel	Presidente	EESC - USP	<u>APROVADA</u>
Eny Maria Vieira	Titular	IQSC - USP	<u>APROVADA</u>
Ruben Bresaola Junior	Titular	UNICAMP - Externo	<u>APROVADA</u>
Cristina Filomêna Pereira Rosa Paschoalato	Titular	UNAERP - Externo	<u>APROVADA</u>
Raquel Fernandes Pupo Nogueira	Titular	UNESP - Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Maria Auxiliadora de Campos Altieri Pin lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Carlos, aos 18 dias do mês de fevereiro de 2011.

Eny Maria Vieira

Cristina Filomêna Pereira Rosa Paschoalato

Ruben Bresaola Junior

Raquel Fernandes Pupo Nogueira

Luiz Antonio Daniel
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 15/03/11 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Engenharia Hidráulica e Saneamento - Área de concentração: Hidráulica e Saneamento.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof. Associado Paulo Cesar Lima Segantine
Presidente da CPG-EESC-USP

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à Norma Suely de Oliveira ,
Luciana de Oliveira Pereira , Joaquim Dorival
Pereira e ao meu amado esposo. Pela força,
inspiração, amor e eterna amizade.

AGRADECIMENTO

Ao meu amado esposo Fábio José Guedes Nascimento pelo amor, apoio, compressão e amizade.

Á Deus e Nossa senhora Aparecida por tudo.

Ao grupo de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e a Ecossistemas Aquáticos e Terrestres IQSC– USP.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC–USP.

Ao Conselho Superior de investigações Científicas (CISC), ao Instituto de Diagnostico Ambiental e estudos da Água (IDAEA) e ao Departamento de Química Ambiental pela estrutura utilizada para a realização das análises na Espanha e parte do doutorado.

Ao prof. Dr. Luiz Antonio Daniel pela orientação, amizade, disponibilidade, por me ajudar e lutar em todos os momentos, bons e difíceis.

A prof. Dr. Eny Maria Vieira pela confiança, amizade, apoio, supervisão e infinita disponibilide tanto pessoal quanto do seu laboratório.

Ao prof. Dr. Vitor Hugo Polisél Paces pela amizade, supervisão e ensinamentos.

A Miren Lopez de Alda pelos ensinamentos, supervisão e amizade durante o doutorado sanduíche.

Ao Prof. Damià Barceló pela orientação durante o doutorado sanduíche.

Ao Prof. Rafael Bastos e Prof. Ann Mounteer pela indicação e orientação na direção dos passos a seguir, além da grande amizade.

As secretárias Sá, Pavi e Rose.

A técnica do LATAR e as técnicas do laboratório de Massas do CISC.

Ao Ministério Espanhol de Ciência e inovação pela ajuda financeira através do projeto SCARCE (Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065) e CEMAGUA (CGL2007-64551/HID) durante o doutorado sanduíche.

Á FAPESP pelo auxilio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa no Brasil (processo nº 2008/070439).

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de doutorado sanduíche na Espanha (processo nº 200100/2009-2).

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de doutorado no Brasil (processo nº 140999/2007-8) .

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado no Brasil, nos últimos 4 meses, a qual foi de grande valia para o término das atividades.

Á Merck (Darmstadt, Germany) pelas colunas de LC doadas.

A república chiqueiro pelas horas de conforto, divertimento e amizade (Gigi, Hugo, Wanderson e Mário).

Aos meus grandes amigos Rodrigo Barros (vulgo Mário), Ana Paula Arquez, Natália Vieira e Raphael Medeiros, o qual sem eles eu não teria chegado tão longe, pelas broncas, ombros emprestados, risadas e muita alegria... Amo vocês.

Ao Cabelo (Ricardo) e Guilherme pela infinita ajuda no laboratório, paciência e amizade.

Ao Futebol Feminino CAASO o qual me dava disposição e raça para continuar.

Aos amigos: Bianca, Marco, Karla, Maria Luiza, Dani, Lú, Vivian, Rafael pelos momentos de alegria no laboratório e amizade.

Aos eternos amigos de Viçosa, incluindo os integrantes do Bloco dos Fêi.

Aos amigos: Moc, Wolf, Leandro, tartaruga, tatinha, Romulo e Henrique pela amizade de toda a vida.

Á minha família: Tia ia, Tia Nilcéia, Tia Neide, Rachel, Vinicius, Paulo Roberto, Alessandra, Lilian, Pablo, Isabela, vó e vô pela amizade, amor e força.

A minha mãe Norma Suely e minha irmã Luciana por existirem, sem vocês eu não seria nada.

Aos amigos feitos durante o doutorado sanduíche na Espanha e para aqueles que me auxiliaram e ajudaram nas coletas de água.

Ao meu pai Joaquim Dorival Pereira que mesmo em pensamento sempre me iluminou e me orientou.

A todos aqueles que integralmente ou parcialmente colaboraram para a realização destes trabalho meu muito obrigado.

RESUMO

PEREIRA, R. O. **Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água.** 2011. 192 f. Tese (Doutorado)- programa de pós-graduação em Hidráulica e saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A poluição dos corpos de água é cada vez maior devido ao lançamento de efluentes, esgotamento sanitário e disposição inadequada de resíduos sólidos. Esse fato causa grande preocupação à comunidade científica, pois à poluição associam-se riscos à saúde causado por poluentes bioativos, compostos químicos orgânicos persistentes e outros compostos que poderiam estar presentes na água. Dentre as substâncias que causam risco à saúde se destacam os desreguladores endócrinos, que são compostos químicos exógenos que interferem na atividade hormonal. Os sistemas de tratamento de água convencionais não removem alguns compostos, tais como pesticidas e hormônios, os quais deveriam ser removidos. O uso do ozônio e cloro vem sendo reportado para tal finalidade, pois atuam como oxidantes que são capazes de oxidar compostos orgânicos, além de serem poderosos desinfetantes. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eliminação e/ou redução dos desreguladores endócrinos - DE em estações de tratamento de água com o uso do ozônio e do cloro. Aliado ao estudo, avaliar qual será a eficiência de remoção de organismos indicadores nas doses utilizadas para oxidação de DE (Coliformes Totais e *E.coli*) e avaliar a ecotoxicidade em peixes de amostras cloradas contendo 17 β -estradiol. O cloro e o ozônio foram capazes de remover eficientemente estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) de águas, contudo a eficiência de remoção diminuiu em concentrações na ordem de ng L⁻¹, necessitando-se de altas doses de ozônio e cloro para a completa remoção dos hormônios estudados. Tanto o cloro como o ozônio foram eficientes na inativação de organismos indicadores nas doses comumente utilizadas em ETAs e nas doses requeridas para a remoção dos contaminantes estudados. Amostras contendo E2 após serem cloradas apresentaram toxicidade crônica a peixes da espécie *Danio rerio*, o efeito estrogênico foi observado principalmente em machos. Foi necessário uma dose de ozônio de 0,95 e 3,8 mg L⁻¹ para a remoção de 93 e 98% de E2 e E1 respectivamente (C₀ = 100 ng L⁻¹). Considerando o cloro como oxidante após a aplicação de 1,5 mg L⁻¹ com tempo de contato de 24 h chegou-se a uma remoção de 99,6 e 97,5% para o E2 e E1 respectivamente (C₀ = 500 ng L⁻¹). Tão importante quanto remover o estrona e o 17 β -estradiol foi verificar e identificar quais foram os subprodutos formados após a oxidação dos mesmos. Foram identificados vários subprodutos tanto utilizando a degradação por meio do cloro como do ozônio. Alguns destes compostos identificados foram persistentes e recalcitrantes. Para o ozônio a completa remoção foi atingida após 10 mg O₃ L⁻¹ e 16 mg O₃ L⁻¹ para os subprodutos do E1 e E2 respectivamente. Considerando o cloro mesmo após um tempo de contato de 16 dias, havia ainda subprodutos da degradação na água.

Palavras-chave: degradação, desinfecção, hormônios, oxidação, subprodutos, tratamento de água.

ABSTRACT

PEREIRA, R. O. **Formation of byproducts of estrone and 17 β -estradiol oxidation using chlorine and ozone in water**. 2011. 192 p. Thesis (Ph.D.) - Graduate Program in Hydraulics and Sanitation, Engineering School of São Carlos, São Paulo University, São Paulo, 2011.

The pollution of water bodies is increasing due to the release of effluents, sewage and inadequate solid waste disposal. This fact causes great concern to the scientific community, because pollution are associated with health risks caused by pollutants of bioactive compounds and other persistent organic compounds that could be present in water. Among the substances that can cause health risks are the endocrine disrupters, which are exogenous chemicals that interfere with hormonal activity. The conventional water treatment systems does not remove certain compounds, such as pesticides and hormones, which should be removed. The use of ozone and chlorine has been reported for this purpose because it acts as an oxidant that can oxidize organic compounds, and additionally are powerful disinfectants. Therefore, the aim of this study was the elimination and / or reduction of endocrine disrupters during the water treatment using ozone and chlorine. Allied to the study, evaluate the efficiency of indicator organisms removal in the doses used for the oxidation of endocrine disrupters (coliform and E.coli) and assess the ecotoxicity of fish in chlorinated samples containing 17 β -estradiol. Chlorine and ozone were able to efficiently remove estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2) of water, but the removal efficiency decreases at concentrations in the ng L⁻¹. Complete removal of the hormones was reach with high doses of ozone and chlorine. Both chlorine and ozone were effective in the inactivation of indicator organisms at commonly doses used in water treatment plants and in the doses required for the removal of the pollutants studied. Samples containing chlorinated E2 had chronic toxicity to fish *Danio rerio*, the estrogenic effect was observed mainly in males, females in some groups estrogenic effect was not observed. The dose of ozone necessary for the removal of 93 and 98% of E1 and E2 (C₀ = 100 ng L⁻¹) were 0.95 and 3.8 mg L⁻¹, respectively. The application of 1.5 mg L⁻¹ of chlorine with a contact time of 24 h achieved removal of 99.6 and 97.5% for E1 and E2 respectively (C₀ = 500 ng L⁻¹). As important as removing estrone and 17 β -estradiol was to verify and identify which were the byproducts formed after oxidation. Several byproducts were identified by the degradation using chlorine and ozone. Some of these compounds were identified to be persistent and recalcitrant. The ozone dose required to the complete removal of the byproducts was achieved after 10 mg L⁻¹ O₃ and 16 mg L⁻¹ O₃ for the byproducts of E1 and E2 respectively. The byproducts of chlorine even after a contact time of 16 days persisted in the water.

Keywords: degradation, disinfection, hormones, oxidation byproducts, water treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica dos estrogênios esteróides (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005).....	30
Figura 2 - Estrutura química do 17 β -estradiol e do estrona	32
Figura 3 - Procedimento para a diminuição do teor de matéria orgânica contida no meio de cultura.	52
Figura 4 - Identificação de coliformes totais em meio Chromocult Coliform Agar	53
Figura 5 - Identificação de <i>E. Coli</i> em meio Chromocult Coliform Agar.....	53
Figura 6 - Exemplo de como a recuperação do analito foi realizada para as diferentes amostras	56
Figura 7 - Extração em fase sólida (SPE).....	57
Figura 8 - Manifold a vácuo	57
Figura 9 - Jar-test utilizado para a mistura dos hormônios durante a oxidação	58
Figura 10 - Foto do tanque de adaptação dos peixes <i>Danio rerio</i>	62
Figura 11 - (A) Todo experimento ecotoxicológico montado (B) Unidade experimental	62
Figura 12 - Amostra de peixe maserado.....	64
Figura 13 - Amostra de peixe maserado após centrifugação.....	64
Figura 14 - Coluna para a ozonização	65
Figura 15 - Gerador de ozônio.....	66
Figura 16 - Analisador de ozônio	66
Figura 17 - Frasco lavador do off-gás	67
Figura 18 - Rotâmetro	67
Figura 19 - Fluxograma dos ensaios, análises e equipamentos realizados durante o doutorado (Brasil) e o doutorado sanduíche (Espanha).....	81
Figura 20 - Espectro de excitação com 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol, emissão em 306 nm e varredura de 200 a 300 nm	82
Figura 21 - Espectro de emissão com 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol, excitação em 230 e 280 nm e varredura de emissão de 280 a 540 nm.....	83
Figura 22 - Espectro de excitação com 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona, emissão em 306 nm e varredura de excitação de 200 a 300 nm	83
Figura 23 - Espectro de emissão com 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona, excitação em 230 e 280 nm com varredura de emissão de 280 a 440 nm.....	84

Figura 24 - Cromatograma de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol fixando a emissão em 306 nm	85
Figura 25 - Cromatograma de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ do estrona fixando a emissão em 306 nm	85
Figura 26 - Cromatograma de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ do estrona fixando a excitação em 230 nm	85
Figura 27 - Fluxograma com a descrição das diferentes metodologias de extração testadas...	86
Figura 28 - Cromatograma comparando os extratos obtidos por diferentes métodos de extração do 17 β -estradiol	87
Figura 29 - Cromatograma com a fase móvel na proporção de 50:50 co-eluição de um composto no tempo de retenção do 17 β -estradiol	89
Figura 30 - Cromatograma da fase móvel na proporção de 58:42 ACN:H ₂ O - interferente no tempo de retenção do 17 β -estradiol.....	89
Figura 31 - 17 β -Estradiol com concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diferentes proporções da fase móvel.....	90
Figura 32 - Seletividade do 17 β -estradiol na proporção da fase móvel de 48:52 ACN:H ₂ O...	91
Figura 33 - Curva analítica do 17 β -estradiol contemplando a faixa linear de 50 ng L ⁻¹ até 1000 ng L ⁻¹ , com extração	92
Figura 34 - Seletividade do 17 β -estradiol com a fase móvel de 60:40 ACN:H ₂ O.....	94
Figura 35 - Cromatograma mostrando o pico referente ao LD da metodologia para detecção do 17 β -estradiol.....	95
Figura 36 - Variação da concentração do 17 β -estradiol para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, sem extração	96
Figura 37 - Variação da concentração do 17 β -estradiol para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$, sem extração	97
Figura 38 - Seletividade do estrona com concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	99
Figura 39 - Variação da concentração do estrona para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	99
Figura 40 - Variação da concentração do estrona para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$	100
Figura 41 - Variação dos parâmetros - Δ = parâmetro no final do ensaio – Parâmetro no início do ensaio na oxidação de E2 por meio do cloro * dados discretos	106
Figura 42 - Comparação entre a degradação de E2 com 2 mg L ⁻¹ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cloro e a variação no pH.....	107
Figura 43 - Remoção de 17 β -estradiol na dose de 0,5 mg Cl ₂ L ⁻¹ - efeito da concentração inicial de E2.....	110
Figura 44 - Remoção de 17 β -estradiol na solução com dosagem inicial de cloro de 1,0 mg Cl ₂	

L ⁻¹ - efeito da concentração inicial de 17β-estradiol	112
Figura 45 - Oxidação da solução contendo 17β-estradiol em diferentes concentrações iniciais com 2,0 mg L ⁻¹ de cloro.....	112
Figura 46 - Efeito da dosagem de cloro na remoção de 17β-estradiol considerando concentrações iniciais de 17β-estradiol	113
Figura 47 - Avaliação do tempo na remoção de 17β-estradiol - 2,0 mg Cl ₂ L ⁻¹ e 100 µg L ⁻¹	113
Figura 48 - Variação da concentração de 17β-estradiol com o tempo de contato para dosagem de cloro de 2 mg Cl ₂ L ⁻¹ - concentração inicial de 17β-estradiol de 100 µg L ⁻¹	114
Figura 49 - Remoção de estrona em diferentes tempos de contato e doses de cloro.....	121
Figura 50 - Remoção de estrona e 17β-estradiol – concentração inicial de 100 µg L ⁻¹ e 2 mg L ⁻¹ de cloro.....	124
Figura 51 - Remoção de estrona e 17β-estradiol – concentração inicial de 500 ng L ⁻¹ e 1,5 mg L ⁻¹ de cloro.	124
Figura 52 - Peixes doentes do tratamento controle de E2 com 50 µg L ⁻¹	127
Figura 53 - Porcentagem da mortalidade acumulada durante os 21 dias de ensaio do tratamento controle positivo com 50 µg L ⁻¹ de E2.	128
Figura 54 - Placa de leitura com as amostras após todo o procedimento para a detecção da proteína VTG.....	129
Figura 55 - Curva de calibração contemplando a concentração de VTG de 0,97 a 125 ng mL ⁻¹	130
Figura 56 - Curva de calibração contemplando a concentração de VTG de 0,48 a 31,25 ng mL ⁻¹	130
Figura 57 - Variação dos parâmetros - Δ = parâmetro no final do ensaio – Parâmetro no início do ensaio A: pH; B: Condutividade; C: Cor aparente; D: Turbidez; E: Alcalinidade total; F: alcalinidade parcial	135
Figura 58 - Remoção de 17β-Estradiol por oxidação com ozônio	137
Figura 59 - Variação das variáveis com o aumento da dosagem de ozônio aplicada (Δ = variáveis no final do ensaio – variáveis no início do ensaio)	139
Figura 60 - Inativação de <i>E.coli</i> e Coliformes totais por meio do ozônio	140
Figura 61 - Remoção de estrona por oxidação com ozônio (C ₀ = 100 µg L ⁻¹).....	141
Figura 62 - Oxidação de estrona e 17β-estradiol (concentração inicial de 100 µg L ⁻¹ e 100 ng L ⁻¹) com diferentes dosagens de ozônio.	142
Figura 63 - Relação Massa/Carga (m/z) e tempo de retenção dos principais produtos com diferentes doses de ozônio identificados na degradação do estrona (E1) A e 17β-estradiol (E2)	

B.	143
Figura 64 - Íon monitorado (m/z 287). Cromatogramas obtidos no UPLC-QqTOF-MS/MS da análise do E2 tratado com $16,7 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ e dos padrões 4OH-E2, 2OH-E2 e 6OH-E2 respectivamente.	145
Figura 65 - Espectro de massas obtido no UPLC-QqTOF-MS/MS na análise de (A) experimento com E2 (íon pai 287) e (B) experimento com E (íon pai 285), e as correspondentes sugeridas estruturas. Voltagem do cono, 30 V; CE, 20 eV.	146
Figura 66 - Rota sugerida para a formação do subproduto com MM 286.....	147
Figura 67 - Rota proposta para a formação dos subprodutos gerados na degradação do E2 com ozônio, MM 278.	147
Figura 68 - Espectro de massas e fragmentação proposta para o subproduto com m/z 277 (A) e m/z 275 (B) formado durante a ozonização do E2 e E1 respectivamente.	148
Figura 69 - Cinética de formação e degradação dos principais subprodutos de degradação encontrados durante a ozonização do E2 (A) e E1 (B).....	150
Figura 70 - Subprodutos encontrados na oxidação de estrona (10 mg L^{-1}) com cloro (5 mg L^{-1}) (tratamento A) em função do tempo. Legenda (m/z e tempo de retenção).	151
Figura 71 - Subprodutos minoritários formados através da oxidação do estrona (10 mg L^{-1}) pelo cloro (5 mg L^{-1}).....	152
Figura 72 - Subprodutos gerados através da oxidação do 17β -estradiol (10 mg L^{-1}) pelo cloro (5 mg L^{-1}) (tratamento B). Legenda (m/z e tempo de retenção).	154
Figura 73 - Possível rota de formação dos subprodutos na degradação do 17β -estradiol pelo cloro.	156
Figura 74 - Subprodutos gerados pela oxidação de estrona (500 ng L^{-1}) com cloro ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) após 16 dias de tempo de contato (tratamento C). Legenda: m/z (primeira transição/ segunda transição).	158
Figura 75 - Subprodutos gerados através da oxidação de estrona (500 ng L^{-1}) pelo cloro ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) após 5 minutos a 16 dias de tempo de contato (tratamento C).....	159
Figura 76 - Subprodutos gerados através da oxidação de 17β -estradiol (500 ng L^{-1}) pelo cloro ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) após 16 dias de tempo de contato (tratamento D).	161
Figura 77 - Cromatograma da amostra número 16 do composto estrona e o padrão interno.	165
Figura 78 - Curva de calibração do estrona calculada pelo programa TargetLynx.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de 17 β -estradiol durante o ciclo hormonal	33
Tabela 2 - Excreção diária de hormônios	33
Tabela 3 - Propriedades físicas e químicas do 17 β -estradiol e do estrona	34
Tabela 4 - Resultados da ocorrência e da concentração de estrona e 17 β -estradiol no ambiente	36
Tabela 5 - Parâmetros microbiológicos de potabilidade da água para consumo humano	41
Tabela 6 - Métodos utilizados para a quantificação das variáveis analisadas (APHA, 2005) .	51
Tabela 7 - Condições utilizadas no CLAE-FLU para a quantificação dos analitos	58
Tabela 8 - Condições aplicadas na oxidação do estrona	60
Tabela 9 - Condições dos ensaios de oxidação do 17 β -estradiol com o cloro	61
Tabela 10 - Descrição dos ensaios de ecotoxicidade.....	63
Tabela 11 - Condições dos ensaios realizados para oxidação de 17 β -Estradiol com ozônio...	68
Tabela 12 - Condições dos ensaios realizados para oxidação de estrona com ozônio	68
Tabela 13 - Descrição dos ensaios realizados para a identificação dos subprodutos formados	71
Tabela 14 - Gradiente da fase móvel utilizado durante a corrida cromatográfica.....	72
Tabela 15 - Descrição dos ensaios de oxidação utilizando o cloro	74
Tabela 16 - Condições utilizadas para a análise qualitativa e quantitativa dos compostos de interesse	74
Tabela 17 - Gradiente da fase móvel utilizado durante a corrida cromatográfica.....	76
Tabela 18 - Data e localização dos pontos de coleta da primeira amostragem de água.....	78
Tabela 19 - Localização dos pontos de coleta da segunda amostragem de água potável.....	78
Tabela 20 - Dados utilizados na construção da curva analítica com a precisão e exatidão dos pontos analisados.....	91
Tabela 21 - Precisão (CV) e exatidão inter e intra- corrida da metodologia considerando a etapa de extração para o 17 β -estradiol	93
Tabela 22 - Porcentagem de recuperação da metodologia considerando a etapa de extração do 17 β -estradiol	93
Tabela 23 - Dados da curva analítica com a precisão (CV) e exatidão	95
Tabela 24 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa	96

Tabela 25 - Porcentagem de recuperação do método para as concentrações baixa, média e alta	96
Tabela 26 - Dados da curva analítica com a precisão (CV) e exatidão	97
Tabela 27 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa	98
Tabela 28 - Porcentagem de recuperação da metodologia sem a etapa de extração nas concentrações baixa, média e alta.....	98
Tabela 29 - Dados da curva analítica contemplando a concentração do estrona de 1,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ com a precisão (CV) e exatidão dos pontos de calibração	100
Tabela 30 - Dados da curva analítica contemplando a concentração do estrona de 10 a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$ com a precisão (CV) e exatidão dos pontos da curva de calibração	100
Tabela 31 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa da curva de calibração de 1,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	101
Tabela 32 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa da curva de calibração de 10 a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$	101
Tabela 33 - Porcentagem de recuperação da metodologia nas concentrações baixa, média e alta	102
considerando a curva de calibração de 1,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	102
Tabela 34 - Porcentagem de recuperação da metodologia nas concentrações baixa, média e alta	102
considerando a curva de calibração 10 a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$	102
Tabela 35 - Tratamentos preliminares com 1 mg L^{-1} de cloro e tempo de contato de 30 min	102
Tabela 36 - Variáveis analisadas antes e após os ensaios com cloro	104
Tabela 37 - Detecção de <i>E.coli</i> em diferentes CT	107
Tabela 38 - Presença de coliformes totais após desinfecção com cloro	108
Tabela 39 - Remoção de 17 β -estradiol em diferentes condições de tratamento com cloro ...	111
Tabela 40 - Dados da remoção de COT ao longo do tempo ($C_0 = 100 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol)	116
Tabela 41 - Tratamento D com cloro 1,5 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ e $C_0 = 500 \text{ ng L}^{-1}$ de E2.....	117
Tabela 42 - Variáveis analisadas no início e no fim dos tratamentos com cloro para oxidação de estrona.....	118
Tabela 43 - Inativação de <i>E. coli</i> e coliformes totais na oxidação de estrona na presença de cloro	118
Tabela 44 - Concentração das diferentes formas do cloro durante os tratamentos	119

Tabela 45 - Degradação de estrona na presença de cloro.....	120
Tabela 46 - Degradação de estrona com 2 mg Cl ₂ L ⁻¹ , tempo de contato de 24 horas e C ₀ = 100 µg L ⁻¹	122
Tabela 47 - Tratamento D com cloro 1,5 mg Cl ₂ L ⁻¹ e C ₀ = 500 ng L ⁻¹ de E1.....	123
Tabela 48 - Média dos valores de pH e OD nos diferentes tratamentos, medidos nos dias 15/04/2010, 21/04/2010 e 06/05/2010.....	125
Tabela 49 - Cloro residual livre após 30 min de tempo de contato	126
Tabela 50 - Distribuição da curva de calibração, machos e fêmeas nos poços da placa de leitura do kit ELISA	129
Tabela 51 - Concentração de VTG nos diferentes tratamentos	131
Tabela 52 - Concentração de ozônio consumido em função da taxa de aplicação de ozônio	133
Tabela 53 - Características da água antes da aplicação do ozônio	134
Tabela 54 - Remoção de 17β-estradiol por oxidação	137
Tabela 55 - Características da água antes da aplicação do ozônio	138
Tabela 56 - Porcentagem de remoção de estrona por oxidação com ozônio.....	140
Tabela 57 - Condições para a identificação dos subprodutos do estrona e 17β-estradiol por UPLC-QqQ-MS/MS.....	149
Tabela 58 - SRM - condições utilizadas para a análise dos subprodutos gerados na reação do estrona (500 ng L ⁻¹) com o cloro (1,5 mg L ⁻¹).....	157
Tabela 59 - SRM - condições utilizadas para a análise dos subprodutos gerados na reação do 17β-estradiol (500 ng L ⁻¹) com o cloro (1,5 mg L ⁻¹).	160
Tabela 60 - Resultado das amostras para o estrona na primeira coleta	163
Tabela 61 - Curva de calibração e exatidão para o estrona na primeira coleta	163
Tabela 62 - Condições para aceitação/rejeição de uma amostra em LC/MS/MS	164
Tabela 63 - Análise do segundo grupo de amostras	165
Tabela 64 - Recuperação do E1 e E2 segundo grupo de amostras	166
Tabela 65 - Porcentagem de recuperação da metodologia dos subprodutos do E1 e E2 no segundo grupo de amostras.....	167
Tabela A1 - Análise de variância - concentração inicial 17β-estradiol (100 µg L ⁻¹)	186
Tabela A2 - Efeito da dose no tempo de contato - concentração inicial 17β-estradiol (100 µg L ⁻¹)	186
Tabela A3 - Efeito do tempo na dose - concentração inicial 17β-estradiol (100 µg L ⁻¹).....	186
Tabela A4 - Análise de variância - concentração inicial 17β-estradiol (1 µg L ⁻¹)	187
Tabela A5 - Efeito do tempo na dose - concentração inicial 17β-estradiol (1 µg L ⁻¹).....	187

Tabela A6 - Efeito da dose no tempo de contato - concentração inicial 17 β -estradiol (1 $\mu\text{g L}^{-1}$)	187
Tabela A7 - Análise de variância - concentração inicial de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona	187
Tabela A8 - Efeito da dose no tempo de contato - concentração inicial de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona.....	188
Tabela A9 - Efeito do tempo de contato na dose - concentração inicial de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona.....	188
Tabela A10 - Peso e número dos peixes por grupo e por tratamento - teste de ecotoxicidade	189
Tabela A11- Cromatograma dos padrões dos subprodutos do estrona e do 17 β -estradiol feito por meio da extração on-line no equipamento LC/MS/MS.....	190

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2OH-E2	2-hidroxi-estradiol
4OH-E2	4-hidroxi-estradiol
ACN	Acetonitrila
ADO	<i>androsta-4,16-dien-3-one</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	ionização química á pressão atmosférica
APPI	fotoionização á pressão atmosférica
BSA	Albumina Sérica Bovina
C18	Octadesilsilano
CLAE	Cromatografia liquida de alta eficiência
CLAE/FLU	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de Fluorescência
CD	Concentração Determinada
CE	Colision Energy (Energia de colisão)
CSIC	Conselho Superior de Investigações Cientificas
COT	Carbono Orgânico Total
CQs	Controles de Qualidade
CT	Concentração vezes o Tempo
CV	Coeficiente de variação
DAD	<i>Diode array detector</i> (Detector de Arranjo de Diodos)
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DE	Desregulador Endócrino
DEO	<i>10e-17b-dihidroxi-1,4-estradieno-3-one</i>
DES	dietilestilbestrol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
DPD	N,N-dietil-p-fenileno diamina
DPR	Desvio Padrão Relativo
E ₁	Estrona
E ₂	17β-estradiol

E ₃	Estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	espectrômetro de massa
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Spray de elétrons)
ETA	Estação de tratamento de água
ETEs	Estação de tratamento de esgoto
FLU	Detector de Fluorescência
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas
GC/MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada a dois espectrômetros de massas em série
HAAs	Ácidos haloacéticos
HEDO	<i>10-hidroxi-1,4-estradieno-3,17-dione</i>
HOCl	Ácido Hipocloroso
HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HRGC	High Resolution Gas Chromatography (Cromatógrafo Gasoso de alta resolução)
HSI	índice somáticos de hepatócitos
IDAEA	Instituto de Diagnostico Ambiental e Estudos da Água
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
KI	iodeto de potássio
K _{ow}	coeficiente de partição octanol/água
LATAR	Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas
LC	Cromatografia líquida
LC/MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a dois espectrômetros de massas em série
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
Log	logaritmo
LQ	Limite de quantificação

MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MCF-7	células humanas cancerígenas mamárias
MeOH	Metanol
ND	Não detectado
NI	Ionização em modo negativo
NR	Não realizado
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
OA	Ozônio aplicado
OC	Ozônio consumido
OCI ⁻	íon Hipoclorito
OD	Oxigênio Dissolvido
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OF	Ozônio no off-gás
OR	Ozônio residual na fase líquida
PAHs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
POPs	poluentes orgânicos persistentes
QqQ	Triplo quadrupolo
RE	Resolução
Reh	Receptor estrogênio humano
SPE	Extração em Fase sólida
SRM	<i>selected reaction monitoring</i> (monitoramento da reação selecionada)
THM	Trihalometanos
TOF	<i>Time of flight</i> (tempo de voo)
TQD	Triple quadrupolo (Quadrupolo triplo)
TS	Testosterona
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USP	Universidade de São Paulo
UT	Unidades de Turbidez

UV	Ultravioleta
VTG	Vitelogenina
YES	Yeast Estrogen Screen

LISTA DE SÍMBOLOS

ng L ⁻¹	nanogramas por litro
µg L ⁻¹	microgramas por litro
d	dia
mg L ⁻¹	miligramas por litro
°C	grau celsius
mm hg	milímetro de mercúrio
Kow	coeficiente de partição octanol/água
h	hora
UT	Unidades de Turbidez
uH	Unidades Hanzen
min	minutos
V	Volts
OH [·]	radical hidroxila
UV	ultravioleta
m/z	relação massa/carga
nm	nanômetros
T	temperatura
rpm	rotações por minuto
Q	Quadrupolo
eV	elétron volts
C ₀	Concentração inicial
n	número de amostras
trat	tratamento
rep	repetição
Tr	tempo de retenção
C	concentração
C.C	curva de calibração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Geral	28
2.2 Secundários.....	28
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 Desreguladores Endócrinos: ação, origem e consequências	29
3.2 Características dos hormônios 17 β -estradiol e estrona	32
3.3 Presença e remoção de 17 β -estradiol e o estrona no ambiente	33
3.4 Desinfecção	39
3.5 Qualidade da água para consumo humano	40
3.6 Cloro	42
3.7 Ozônio	43
3.8 Identificação de subprodutos	45
3.9 Análise e determinação de estrógenos.....	45
3.9.1 Atividade Estrogênica	46
3.9.2 Quantificação de Estrógenos	47
3.9.3 Validação de métodos.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Oxidação de 17 β -estradiol e estrona.....	51
4.1.1 Água de estudo	51
4.1.2 Cultivo, preservação, preparo e quantificação de microrganismos	52
4.1.3 Desenvolvimento do método para a quantificação de 17 β -estradiol e estrona.....	53
4.1.4 Metodologia de extração	56
4.1.4.1 Condições de extração	57
4.1.5 Quantificação dos hormônios por cromatografia líquida acoplada ao detector de fluorescência.....	57
4.1.6 Ensaios de oxidação com cloro	58
4.1.6.1 Ensaios de oxidação de estrona pelo cloro	60
4.1.6.2 Ensaios de oxidação do 17 β -estradiol pelo cloro	60
4.1.6.3 Ensaio de toxicidade crônica e efeito estrogênico em peixes.....	61

4.1.7 Ensaio de oxidação com ozônio.....	65
4.1.7.1 Ensaio de oxidação do 17 β -estradiol com ozônio	68
4.1.7.2 Ensaio de oxidação do estrona com ozônio	68
4.2 Identificação dos subprodutos da oxidação do estrona e 17 β -estradiol	69
4.2.1 Identificação dos subprodutos da oxidação do estrona e 17 β -estradiol utilizando ozônio	69
4.2.1.1 Reagentes e soluções	69
4.2.1.2 Preparação das amostras	69
4.2.1.3 Identificação de subprodutos	70
4.2.1.4 Identificação dos subprodutos por UPLC-QqToF-MS/MS	71
4.2.1.5 Identificação dos subprodutos da oxidação por UPLC-QqQ-MS/MS	72
4.2.2 Identificação dos subprodutos da oxidação do estrona e 17 β -estradiol utilizando cloro	73
4.2.2.1 Reagentes e soluções	73
4.2.2.2 Descrição dos ensaios com cloro	73
4.2.2.3 Preparação das amostras - extração off line	75
4.2.2.4 Preparação das amostras - Extração on-line	75
4.2.2.5 Equipamento - UPLC-QqToF (UPLC/MS/MS)	75
4.2.2.6 Equipamento - LC-QqQ- (LC/MS/MS)	76
4.2.2.7 Equipamento - UPLC-TQD (UPLC/MS/MS)	76
4.2.2.8 Amostras de água potável	77
4.2.3 Descrição do desenvolvimento dos métodos	79
4.3 Apresentação e análise dos dados	80
4.4 Resumo do Material e Métodos	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1 Desenvolvimento da metodologia para a identificação dos hormônios	82
5.2 Validação de métodos para determinação de estrona e 17 β -estradiol	87
5.2.1 Validação do método para a determinação do 17 β -estradiol considerando a etapa de extração	88
5.2.2 Validação do método para determinação do 17 β -estradiol sem a etapa de extração	93
5.2.3 Validação da método para a determinação do estrona considerando a etapa de extração	98

5.3 Ensaio de oxidação com cloro	102
5.3.1 Oxidação do 17 β -estradiol.....	103
5.3.2 Oxidação do Estrona.....	118
5.3.3 Eficiência do cloro na remoção dos hormônios – Comparação entre estrona e 17 β -estradiol	123
5.3.4 Ensaio de ecotoxicidade - Oxidação do 17 β -estradiol por meio do cloro	125
5.4 Oxidação com ozônio	133
5.4.1 Oxidação do 17 β -estradiol.....	133
5.4.2 Oxidação do Estrona.....	137
5.4.3 Eficiência do ozônio na remoção dos hormônios - Comparação entre estrona e 17 β -estradiol	141
5.5 Ensaio de oxidação com ozônio: formação e identificação de subprodutos	142
5.6 Tratamento com cloro: formação e identificação de subprodutos.....	151
5.7 Análise de água potável.....	162
5.7.1 Primeiro grupo de amostras (Tratamento E)	162
5.7.2 Segundo grupo de amostras (Tratamento F).....	164
6 CONCLUSÕES	168
7 RECOMENDAÇÕES.....	171
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
9 APÊNDICE	186

1 INTRODUÇÃO

O estrogênio ovariano biologicamente mais potente é o 17β -estradiol. Ele é secretado pelo ovário, onde grande parte deste é desidrogenado e biotransformado em estrona, que é o segundo estrogênio mais potente no organismo de seres humanos. Por conseguinte, devido às características do 17β -estradiol e do estrona, estes compostos foram selecionados para este estudo.

Além de serem estrogênios potentes, o estrona e o 17β -estradiol, podem causar alterações mesmo em baixas concentrações (ng L^{-1}) e podem estar presentes em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e consequentemente na água afluyente de estações de tratamento de água (ETAs). Portanto, é importante avaliar a eliminação e/ ou redução destes desreguladores endócrinos (DE) nas estações de tratamento de água. Para isso dois oxidantes; o cloro livre e o ozônio foram empregados neste estudo. O cloro é amplamente utilizado nas ETAs do Brasil como agente desinfetante e o intuito foi de verificar sua eficiência na remoção destes compostos. O ozônio é um potente oxidante, utilizado como agente desinfetante que possui potencial de oxidação maior do que do cloro e também foi selecionado para atuar na oxidação do 17β -estradiol e do estrona em água. Tão importante quanto remover o estrona e o 17β -estradiol é verificar e identificar quais foram os subprodutos formados após a oxidação dos mesmos, o que foi feito no presente estudo.

A pesquisa sobre hormônios está começando no Brasil e já há evidências da contaminação das nossas águas com esses hormônios. Por isso é importante aumentar nosso conhecimento sobre estes micropoluentes e do risco que a flora, fauna e a espécie humana podem estar correndo com a continua exposição a estes compostos. Salienta-se que não há qualquer tipo de norma que regule este tipo de composto e de seus subprodutos no meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a formação e degradação dos subprodutos do estrona e 17 β -estradiol da água de abastecimento por meio da oxidação com cloro e ozônio.

2.2 Secundários

- Otimizar e validar as condições cromatográficas e o método para a determinação dos hormônios 17 β -estradiol e estrona em amostras de água utilizando a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência;
- Avaliar as melhores condições (tempo e dosagem) de oxidação com ozônio e com cloro para a remoção de estrona e 17 β -estradiol;
- Avaliar a inativação de organismos indicadores de contaminação fecal, coliformes totais e *E.coli*, nas dosagens propostas para a oxidação de 17 β -estradiol e estrona;
- Avaliação da ecotoxicidade crônica em peixes da espécie *Danio rerio* após exposição a uma solução contendo 17 β -estradiol previamente clorada;
- Avaliação dos subprodutos do estrona e do 17 β -estradiol formados durante a oxidação com cloro e ozônio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Desreguladores Endócrinos: ação, origem e consequências

A presença de contaminantes orgânicos altamente biorecalcitrantes na hidrosfera devido à atividade industrial e agricultura intensiva tem levado a uma preocupação particular com a qualidade das águas superficiais, subterrâneas e marinhas.

Os riscos associados à saúde causados por substâncias bioativas, poluentes orgânicos persistentes (POPs) e outros compostos químicos presentes na água são de grande preocupação, fazendo-se necessário o monitoramento de tais compostos considerando principalmente locais onde a prática de reúso de água já é feito (PEREZ et al., 2006).

Dentre os compostos que causam risco à saúde humana destacam-se os desreguladores endócrinos (DE), que são compostos químicos exógenos que interferem na atividade hormonal pela ação de receptores. Tais substâncias podem ser de origem antrópica, também denominadas xenobióticos, ou de origem natural, tais como os fitoestrogênios.

De acordo com a Environmental Protection Agency (USEPA, 1997) um desregulador endócrino “é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostasia, reprodução, desenvolvimento e comportamento”. A Organização Mundial da Saúde define um disruptor endócrino como “uma substância ou mistura delas que alteram as funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos à saúde de um organismo, na sua descendência ou na sua população” (WHO, 2002).

O sistema endócrino consiste de glândulas que controlam o envio das mensagens para a liberação de substâncias químicas conhecidas como hormônios, que são distribuídas no corpo humano através da corrente sanguínea. Os hormônios são mensageiros químicos responsáveis pela comunicação entre diferentes tipos de células, as quais identificam os hormônios através de receptores que são estruturas protéicas especializadas em reconhecimento molecular. Depois do reconhecimento do hormônio ocorre uma série de reações bioquímicas que levam a respostas biológicas específicas. Os hormônios controlam funções primordiais no corpo, como: crescimento, desenvolvimento de órgãos sexuais, manutenção da homeostasia dentre outras. Alguns dos principais órgãos produtores de hormônios são: a hipófise, o hipotálamo, a tireóide, as paratireóides, as suprarrenais, o

pâncreas e as gônadas (testículos e ovários) (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005).

Os hormônios esteróides (estrógenos, andrógenos, glicocorticóides e mineralocorticóides) são substâncias biologicamente ativas que são sintetizados a partir do colesterol. Os esteróides naturais são secretados nos seres humanos e animais pelo córtex supra-renal, testículos, ovários e placenta (RAVEN; JOHNSON, 1999). Os estrógenos são hormônios principalmente femininos e os andrógenos principalmente hormônios masculinos.

Os DE agem ligando-se ao receptor do estrogênio, mimetizando ou bloqueando o hormônio, e podem causar um efeito agonista ou antagonista no ser vivo. O efeito agonista é a capacidade de uma substância exógena em acoplar-se ao receptor e gerar uma resposta. Em contrapartida, o efeito antagonista é a capacidade de uma substância em acoplar-se ao receptor do estrogênio e bloquear o sítio do receptor, evitando assim, que uma resposta seja gerada. Um DE pode ainda interferir em cada um dos estágios da dinâmica hormonal, como na produção, na excreção ou na biotransformação dos hormônios (MAIA; DEZOTTI, 2007).

A estrutura básica dos estrogênios são: 18 carbonos contendo um anel fenólico (um anel aromático com grupo hidroxila no carbono 3 e um grupo hidroxílico ou cetona na posição 17 do anel D) (Figura 1). O anel fenólico é o principal componente estrutural responsável pela alta afinidade com os receptores estrogênicos (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005).

Figura 1 - Estrutura básica dos estrogênios esteróides (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005)

Uma substância exógena induz a alterações que são caracterizadas de dois modos: ou por meio de uma modulação endócrina, onde ocorre interferência de menor amplitude não levando a efeito drástico, portanto passível de recuperação, ou através dos desreguladores endócrinos do qual os efeitos são mais severos, e muitas vezes a reversão não é mantida (SETAC, 2000).

Em geral o sistema endócrino de organismos adultos é resistente a mudanças impostas pela exposição à substância química, embora esse sistema seja passível de danos. Entretanto,

alterações durante períodos sensíveis ou críticos de desenvolvimento (como no desenvolvimento embrionário) podem gerar alterações importantes, as quais podem se manifestar em fases tardias do ciclo de vida ou mesmo serem repassadas às gerações posteriores (THOMAS, 1998 ¹ apud REIS FILHO et al., 2007).

O efeito dos DE foi inicialmente observado na década de 1980 em colônias de aves da região dos Grandes Lagos (América do Norte) que desenvolveram características femininas após serem expostas ao praguicida organoclorado dicloro difenil tricloroetano (DDT) (SETAC, 2000), sendo o mesmo fenômeno encontrado em populações de jacarés de lagos no estado da Flórida-EUA (REIS FILHO et al., 2007). Outra grande evidência dos efeitos dos DE, porém em seres humanos, foi obtida a partir da experiência com mulheres grávidas que tomaram dietilestilbestrol (DES), prescrito para evitar aborto espontâneo no período de 1948 a 1971. Muitas das filhas destas mulheres tornaram-se estéreis, e uma minoria desenvolveram um tipo raro de câncer vaginal.

O uso dos estrogênios durante a gravidez pode aumentar a incidência de anormalidades genitais não-malignas em bebês de ambos os sexos. Por esta razão, as gestantes não devem usar estrogênios, tendo em vista a possibilidade de ocorrerem efeitos tóxicos no trato reprodutor. Embora os estrogênios não sejam mais administrados intencionalmente às gestantes, existe a preocupação de que a exposição durante a gravidez aos compostos ambientais, que possuem atividade estrogênica, possa causar anormalidade do desenvolvimento fetal (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005).

Além desses, outros efeitos endócrinos têm sido observados e podem ser atribuídos aos desreguladores endócrinos, tais como: diminuição na quantidade de esperma, o aumento de câncer de mama em mulheres e o aumento de certas anormalidades no sistema reprodutivo humano (LAGANA et al., 2004). Dos vários grupos de substâncias com propriedades de produzir distúrbios endócrinos os hormônios femininos e os esteróides sintéticos são considerados os compostos com maior potencial estrogênico (ALDA; BARCELÓ, 2000).

Um dos problemas atribuídos aos DE é que algumas dessas substâncias já se encontram efetivas em valores baixos, cerca de ng L^{-1} , enquanto que outros compostos possuem algum efeito e são biologicamente ativos ao nível de $\mu\text{g L}^{-1}$ (ASCENZO et al., 2003). De acordo com Alda e Barceló (2001) os compostos estrogênicos mais potentes (17 β -estradiol e o etinilestradiol) são capazes de induzir alterações nos sistemas endócrinos de organismos vivos em concentrações abaixo de $1,0 \text{ ng L}^{-1}$.

¹ THOMAS, J. A. Drugs and chemicals that affect the endocrine system. **Int. J. Toxicol.** v.17, n. 2, p.129-138, 1998.

Os hormônios, tanto naturais como sintéticos, são usados em vários tratamentos tais como: sintomas de menopausa, deficiência do hormônio de crescimento, hipotireoidismo e algumas formas de cânceres, sendo alguns usados como contraceptivo oral (YING et al., 2002).

3.2 Características dos hormônios 17 β -estradiol e estrona

O 17 β -estradiol e estrona são predominantemente hormônios femininos importantes para a manutenção da reprodução das células dos seios, da pele e do cérebro (Figura 2). O 17 β -estradiol é responsável pelo desenvolvimento das características secundárias sexuais femininas e reprodução. É um estrogênio natural, contudo produzido em grandes quantidades para ser usado em contraceptivos orais e para a reposição hormonal. Já o estrona é um metabólito natural do 17 β -estradiol, sendo também um ingrediente ativo de um estrogênio usado no tratamento de reposição hormonal (IKEHATA et al., 2006).

Figura 2 - Estrutura química do 17 β -estradiol e do estrona

Os DE em questão são naturalmente produzidos pelos organismos. A produção de hormônios na mulher varia de acordo com o ciclo em que a mesma se encontra, a não ser que esteja grávida. O ciclo menstrual divide-se em três fases: folicular, ovulatória e luteínica. A fase folicular denomina-se assim devido ao desenvolvimento característico dos folículos dos ovários. No início desta fase os baixos níveis de 17 β -estradiol e de progesterona fazem com que o revestimento uterino (endométrio) degenere e se desprenda na menstruação. A fase ovulatória inicia-se ao aumentar o hormônio luteinizante e é caracterizada pela libertação do óvulo. O nível de 17 β -estradiol chega ao seu ponto máximo e o nível de progesterona começa a subir. A fase luteínica começa depois da ovulação e dura cerca de 14 dias. Se o óvulo não for fertilizado, o corpo lúteo degenera e deixa de produzir progesterona, o nível de 17 β -estradiol desce e inicia novo ciclo menstrual (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005).

A concentração de 17 β -estradiol, no organismo, correspondentes a cada ciclo menstrual é apresentada na Tabela 1, e na Tabela 2 encontra-se os valores da excreção diária

de hormônios de homens e mulheres em diferentes fases da vida, podendo chegar a valores altos como $600 \mu\text{g d}^{-1}$ (JOHNSON et al., 2000). Portanto, estes hormônios são constantemente liberados na urina em quantidades que poderia afetar a vida aquática e estarão presentes nos esgotos domésticos.

Tabela 1 - Concentração de 17β -estradiol durante o ciclo hormonal

Períodos	17β -Estradiol (ng L^{-1})
Fase Folicular	20 – 120
Fase Ovulatória	120 – 400
Fase Luteínica	60 – 260
Pré-menopausa	5 – 20

Fonte: (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005; LINHARES, 1993).

Tabela 2 - Excreção diária de hormônios

Excreção ($\mu\text{g d}^{-1}$)	17β -Estradiol	Estrona
Homens	1,6	3,9
Mulheres em menstruação	3,5	8
Mulheres em menopausa	2,3	4
Mulheres em gestação	259	600

Fonte: (JOHNSON et al., 2000).

3.3 Presença e remoção de 17β -estradiol e o estrona no ambiente

Os estrogênios naturais são biotransformados, primeiramente no sistema hepático e parcialmente nos músculos, rins e gônadas, sendo degradados a compostos estrogênicos menos ativos conjugados a ácidos sulfúrico e glicurônico (GILMAN et al., 2003). Entretanto, a ocorrência de estrogênios “livres” em ETEs indica que os metabólitos de estrogênios são convertidos de volta a sua forma ativa durante o tratamento dos efluentes. Alguns pesquisadores sugerem que a desconjugação ocorre durante o processo biológico na própria ETE (TERNES et al., 1999ab; CHEN; HU, 2009a). Logo, os hormônios naturais e sintéticos permanecem na sua forma ativa e podem contaminar os corpos receptores. Rodriguez-Mozaz et al. (2004) detectaram estrona-3-sulfato nas águas do rio Llobregat na Espanha com concentração de $0,33 \text{ ng L}^{-1}$. No Brasil também foram detectados, na análise de 20 amostras de água, estradiol-17-glucoronide em 11 amostras com média de $3,5 \text{ ng L}^{-1}$ e estradiol-3-sulfato em 2 amostras com média de $0,72 \text{ ng L}^{-1}$ (KUSTER et al., 2009).

A degradação de 17β -estradiol por sistemas aeróbios de acordo com Lee e Liu (2002) é de 88% após 1 dia e para sistemas anaeróbios é de 50% após 5 dias. Por conseguinte,

dependendo do tipo de tratamento a que o efluente está submetido e também do tempo de contato deste, pode ser que os compostos estrogênicos estejam presentes nos efluentes das ETEs. Após serem lançados em corpos receptores podem ser removidos por fotodegradação, contudo sua remoção é lenta, com meia vida de 10 dias para o 17 β -estradiol (JURGENS et al., 2002).

A maioria dos dados encontrados de DE em ETA é devido a sua presença no manancial. A ineficiência na remoção destes compostos durante o tratamento de esgoto resulta na presença dos mesmos no efluente final (BIRKETT; LESTER, 2002). Por conseguinte, a captação de água pode ocorrer após a descarga de esgoto sanitário tratado ou não. Esta água pode estar contaminada e se tornar uma fonte adicional de desreguladores endócrinos no corpo humano (LEINSTER et al., 1981).

A presença de DE em águas pode ocorrer de diferentes maneiras. Podem estar presentes no manancial, podem ser formados durante o tratamento de água, quando compostos clorados e oxigenados são produzidos como resultado da desinfecção (subprodutos com potencial endócrino) e pode ocorrer a contaminação da água tratada por contato com material contaminado (BIRKETT; LESTER, 2002). Outra fonte importante é a poluição difusa, Ying et al. (2009) encontraram na zona rural um maior valor de equivalente estrogênico do que na zona urbana, significando que a poluição difusa pode ter uma grande importância na contaminação das águas, principalmente em áreas com intensa atividade agropecuária, podendo os contaminantes estrogênicos chegar ao corpo receptor sem passar por nenhum tratamento.

As condições ambientais determinam se um composto químico estará presente na fase aquosa tais como, o potencial de adsorção, a solubilidade do composto e o potencial de evaporação (Tabela 3). Estas condições são importantes, pois muitos DEs têm alta adsorção (bioconcentração) e baixa solubilidade e volatilidade, tendendo a ficar nos sedimentos ao invés de dissolver na fase aquosa (BIRKETT; LESTER, 2002).

Tabela 3 - Propriedades físicas e químicas do 17 β -estradiol e do estrona

Composto	Fórmula	Solubilidade em água mg L ⁻¹ 20 °C	Pressão de Vapor (mm Hg)	Massa Molar	Log K _{ow}
17 β -Estradiol (E2)	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	13	2,3 x 10 ⁻¹⁰	272,4	3,94
Estrona (E1)	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	13	2,3 x 10 ⁻¹⁰	270,4	3,43

Dados apresentados por Ying et al. (2002) indicam que os esteróides estrogênicos são adsorvidos moderadamente nos sedimentos. Os processos de sorção dos compostos são

predominantes a partir do valor do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) igual a 3. Assim, 17 β -estradiol ($\log K_{ow} = 3,94$), e estrona ($\log K_{ow} = 3,43$) têm preferência pela fase sólida. Os valores de K_{ow} destes esteróides sugerem que sua natureza seja hidrofóbica e tenha alta afinidade com as partículas do solo e sedimento. Porém, Bowman et al. (2003), em estudos de partição entre sedimento e água simulando várias condições ambientais, concluíram que, embora as partículas tenham uma forte influência no comportamento dos estrogênios, a sorção é relativamente limitada, com a maioria permanecendo na fase aquosa. A sorção no sedimento ocorre preferencialmente dentro de 24 horas, sendo maior para os hormônios com maior K_{ow} . O sedimento é responsável por menos de 1% da remoção de estrogênios presentes na coluna de água (HOLTHAUS et al., 2002). Conseqüentemente, uma vez atingida à saturação dos sedimentos, estes se tornam praticamente nulos para atuar na remoção de novos lançamentos de hormônios. Por conseguinte, os dados presentes na Tabela 4 podem levar a consideração que estes compostos têm sido amplamente detectados não só nas águas superficiais, mas também nas águas subterrâneas.

Tabela 4 - Resultados da ocorrência e da concentração de estrona e 17 β -estradiol no ambiente

Local da coleta	Concentração (ng L ⁻¹)		Equipamento	Referência	País/Ocorrência
	17 β -estradiol	Estrona			
Rio Atibaia (captação)	106 $\pm$ 6	ND	HPLC/DAD/FLU	Raimundo, 2007	BRASIL
Rio Atibaia	319 $\pm$ 43	ND			
Rio Capivari (próximo à captação)	252 $\pm$ 81	ND			
Ribeirão Pinheiros	354 $\pm$ 29	ND			
Ribeirão Anhumas	6806-464	ND			
Rio Jundiá	4352-456	ND	HPLC/DAD/FLU	Sodré et al., 2007	BRASIL
Ribeirão Anhumas	251	ND			
Rio Capivari (próximo a captação)	38	ND			
Rio Jundiá	51	ND	GC/MS	Zuo et al., 2006	EUA
Rio Acushnet	0,83	1,2			
Rios	7,1 – 0,5	17- 0,2			
Rio- Dan Shui	1,4-33,9	22,4-66,2			
Água de Rios	ND	1,7 – 5,0			
Córrego Rico -Jaboticabal (nascente)	16 e 30,6	ND	LC/MS/MS	Chen et al., 2007	TAIWAN
Córrego Rico - Jaboticabal	8,6 e 10	600			
Córrego Rico - Jaboticabal captação (abastecimento)	25,8	ND			
Córrego Rico - Jaboticabal (antes da desinfecção)	6,8	ND			
Rio Llobregat	ND	22			
Rio Llobregat	ND	4	LC/MS/MS	Rodriguez-Mozaz et al., 2004b	ESPANHA
Rio Llobregat	NR	0,68			
Estuário Scheldt	ND	$\leq$ 10			
Água superficial – Rio Guariroba	<6,25	<500 e >250	GC/MS	Noppe et al., 2007	FRANÇA
Água superficial – Rio Lageado	ND	<500 e >250			
Água superficial - antes da ETE	ND	1,8 á 141,6			
Água superficial - depois da ETE	ND	41,6 á 592,7	GC/MS	Souza, 2008	BRASIL
				Bicchi et al., 2009	ITÁLIA
				Bicchi et al., 2009	ITÁLIA
					Continua

Local da coleta	Concentração (ng L ⁻¹)		Equipamento	Referência	País/ocorrência
	17 β -estradiol	Estrona			
Água bruta	3,0 - 9,07	0,15-11,6	LC/MS/MS	Gerolin, 2008	BRASIL
Mananciais	1,5 a 36,8	NR	LC/MS	Mierzwa et al., 2009	BRASIL
Água Tratada	0,78-1,48	0,07- 0,1	LC/MS/MS	Gerolin, 2008	BRASIL
Água potável	0,2-2,1	0,2-0,6	HRGC/MS	Kuch; Ballschmit, 2001	ALEMANHA
Água potável	LD>LQ	LD>LQ	GC/MS	Sodré et al., 2010	BRASIL
Água Tratada	2600- 2200	< 3300	GC/MS	Ghiselli, 2007	BRASIL
Água superficial	ND	0,3	LC/MS/MS	Vulliet et al., 2008	FRANÇA
Água subterrânea	64, 41 e 34	NR	LC/TOF/MS	Thompson et al., 2009	USA
Água subterrânea	0,79	1,6	GC/MS	Hohenblum et al., 2004	ÁUSTRIA
Água subterrânea	0,3-1,3	0,8-3,5	LC/MS/MS	Vulliet et al., 2008	FRANÇA
Efluente da ETE	4,5-44,5	10,2-48,6	LC/MS/MS	Chen et al., 2007	TAIWAN
Esgoto Bruto	3	2,4	GC/MS/MS	Carballa et al., 2004	ESPANHA
Esgoto Tratado	ND	4,4	GC/MS/MS	Carballa et al., 2004	ESPANHA
ETE Araraquara	31	ND	HPLC/FLU	Araújo, 2006	BRASIL
Esgoto Bruto	21	40	GC/MS/MS	Ternes et al., 1999	BRASIL
Efluentes	<1	2,2-36	LC/MS/MS	Kim et al., 2007	KOREA
5 efluentes de ETE	1,4 á 5,7	9,1 á 32,2	ELISA	Ying et al. 2009	AUSTRÁLIA
Efluente ETE	ND	95,9 á 200	GC/MS	Bicchi et al. 2009	ITÁLIA
					conclusão

NR: Não realizado; ND: não detectado; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação

Como demonstrado na Tabela 4 o estrona e o 17 β -estradiol têm sido encontrados em efluentes após o tratamento de esgoto, em rios, água subterrânea e raramente na água potável (SNYDER et al., 2006; WEBB et al., 2003). Após o pré-tratamento, tratamento primário e tratamento secundário com lodo ativado, o 17 β -estradiol foi eliminado e a concentração de estrona aumentou devido à conversão do 17 β -estradiol em estrona (CARBALLA et al., 2004).

Na ETE localizada no Brasil, foram detectados 17 β -estradiol e estrona no esgoto bruto, produzindo carga total diária acima de 5 g d⁻¹. A remoção observada foi de 99,9% e 83% para o 17 β -estradiol e estrona, respectivamente, após o tratamento por lodo ativado. Portanto, mesmo após o tratamento de esgoto os hormônios podem chegar aos rios e lagos e contaminar as água para abastecimento público (TERNES et al., 1999a). A concentração média em efluentes de ETEs varia de 20-55 ng L⁻¹ para o estrona e de 9-20 ng L⁻¹ para o 17 β -estradiol (POSTIGO et al., 2009).

Em águas superficiais foram encontradas concentrações na ordem de 1 a 20 ng L⁻¹ para 17 β -estradiol e 1 a 50 ng L⁻¹ para o estrona (Tabela 4). Contudo, concentrações elevadas foram detectadas por Bicchi et al. (2009) após o lançamento do efluente de uma ETE - 592 ng L⁻¹ de E1. Em geral, estrona é o estrogênio mais frequentemente detectado. A degradação de 17 β -estradiol em estrona, e nas formas conjugadas durante o tratamento de esgotos pode contribuir para a maior presença de E1 nas águas superficiais como sugerido por Chen et al. (2009b).

Na Áustria, em águas subterrâneas, foram encontrados 17 β -estradiol e estrona em um monitoramento ambiental. Para o estrona, em uma total de 109 amostras, foram detectadas em 20 amostras concentrações acima do limite de quantificação, com o máximo de 1,6 ng L⁻¹. Para o 17 β -estradiol em uma total de 112 amostras, 58 apresentaram o hormônio em questão com uma média de 0,13 ng L⁻¹ (HOHENBLUM et al., 2004). Vulliet et al. (2008) também detectaram estrona e 17 β -estradiol em águas subterrâneas. Em ambos os estudos, estrona foi o estrogênio mais abundante, no entanto altas concentrações de 17 β -estradiol foram detectadas por Thompson et al. (2009) em uma água de poço coletada perto de uma granja de suínos.

Foi encontrado em Campinas-SP, na ETA Sumaré e em água bruta (rio Atibaia), estrona e 17 β -estradiol utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS). As concentrações médias obtidas para água tratada em Campinas e Sumaré foram respectivamente de 0,1 e 0,06 ng L⁻¹ de estrona e 0,93 e 1,30 ng L⁻¹ de 17 β -estradiol. A atividade estrogênica para água tratada na ETA de Campinas equivale a 276 ng L⁻¹ de 17 β -estradiol e na ETA de Sumaré a 473 ng L⁻¹ de 17 β -estradiol. A ETA de Campinas remove em média, mais do que 80% dos DE

estudados. Na ETA de Sumaré, a eficiência de remoção foi de 80% para estrona e 17 β -estradiol (GEROLIN, 2008). Foi encontrado, na água potável no Brasil, 17 β -estradiol com uma concentração de 6,8 ng L⁻¹ (LOPES, 2007) e em outro estudo, durante a estação de seca, estrona e 17 β -estradiol foram detectados em 17% e 8% de todas as amostras de água coletadas, respectivamente (SODRÉ, et al., 2010). Nos EUA, na água bruta, na entrada da ETA, foram detectados 17 β -estradiol uma vez (17 ng L⁻¹) e estrona, que foi detectado em 15 das 19 amostras coletadas, com uma média de 0,3 ng L⁻¹ (BENOTTI et al., 2009).

Aparentemente, sistemas como precipitação química com alumínio e ferro não são efetivos na remoção ou transformação de compostos estrogênicos (SVENSON et al., 2003). A remoção por coagulação com sulfato de alumínio foi de 5% para o estrona e de 2% para o 17 β -estradiol (WESTERHOFF et al., 2005). Chen et al. (2007), após coagulação e floculação com sulfato de alumínio (5 mg L⁻¹), obtiveram remoção de 30 a 50%. No mesmo estudo, na etapa de filtração rápida, a remoção foi de 95 a 99%, contudo após estudar com mais detalhes a causa da alta eficiência encontrada, concluíram que esta foi devido à adsorção dos estrogênios pelo antracito, pois nas mesmas condições testaram a remoção com filtro de areia apenas e obtiveram de 31 a 42% de remoção.

Tradicionalmente, métodos físicos (adsorção em carvão ativado, osmose-reversa e nanofiltração) podem ser usados para a remoção de tais poluentes (KIM et al., 2007; WESTERHOFF et al., 2005). Carvão ativado (5 mg L⁻¹ com 4 h de tempo de contato) foi capaz de remover 76 e 84% de estrona e 17 β -estradiol respectivamente (WESTERHOFF et al., 2005). Nanofiltração removeu de 60 a 85% e mostrou-se mais eficiente do que a ultrafiltração para a remoção de compostos estrogênicos (< 40%) (YOON et al., 2006; MCCALLUM et al., 2008). Não obstante, adsorção em carvão ativado, osmose reversa e nanofiltração são métodos que geram resíduos e o pós-tratamento do material absorvente ou resíduo são necessários, sendo uma desvantagem no uso destes tratamentos. Por conseguinte, a oxidação surge como técnica que não gera resíduo e pode ser utilizada para a descontaminação das águas que contenham DE, contudo também podem possuir a desvantagem na geração de subprodutos tóxicos.

3.4 Desinfecção

O lançamento de esgoto sanitário em locais próximos ao ponto de captação de água pode acarretar contaminação por DE e também aumentar significativamente a concentração de organismos patogênicos, levando a uma possível transmissão de doenças de veiculação

hídrica. É necessário que se avalie a inativação de organismos patogênicos que podem causar danos a saúde, aliado ao estudo de remoção de DE em estações de tratamento de água.

A desinfecção em si consiste na etapa do tratamento em que ocorre a inativação dos microrganismos patogênicos, através de agentes físicos e/ou químicos. Estes microrganismos podem vir a causar sintomas tais como a diarreia, febre e em casos extremos levar à morte. A infecção varia intrinsecamente com a virulência do patogênico, a dose infectante e a resistência imunológica do indivíduo (DANIEL et al., 2001). Portanto, a desinfecção reduz os riscos de uma pessoa contrair doenças pelo sistema de tratamento de água.

Os microrganismos emergentes, tais como *Giardia* e *Cryptosporidium*, são de grande preocupação devido à baixa dose infectante e a alta permanência na água, por até 3 meses devido à formação de cistos e oocistos, além de serem reconhecidamente bem mais resistentes à desinfecção que bactérias e vírus, particularmente à cloração (USEPA, 1998, 2001). Por conseguinte, há a necessidade de buscar maior eficiência na etapa de desinfecção com vista a aumentar a remoção de microrganismos nas ETAs. Além da ação desinfetante os oxidantes podem ser usados em ETAs para a oxidação de ferro e manganês, manter residual de desinfetante para evitar o crescimento de organismos patogênicos e possíveis contaminações na rede, remover gosto e odor, melhorar a eficiência da coagulação e filtração, prevenir o crescimento de algas na sedimentação e filtração, agir como indicador da integridade do sistema de distribuição e intensificar a remoção de cor (DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

3.5 Qualidade da água para consumo humano

Toda a água destinada ao consumo humano deve obedecer ao padrão de potabilidade estabelecido pela portaria 518 de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004) de uso obrigatório em todo território nacional e está sujeita à vigilância da qualidade da água. Alguns dos microrganismos indicadores servem como ferramenta para garantir a qualidade da água distribuída e estão apresentados na Tabela 5.

Como complementação ao padrão microbiológico, a turbidez após a desinfecção (água subterrânea) deve ser no máximo de 1,0 uT em 95% das amostras e após filtração rápida - tratamento com ciclo completo ou filtração direta - 1,0 uT (BRASIL, 2004). Após a desinfecção, a água deve conter teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg L⁻¹, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg L⁻¹ em qualquer ponto da rede de distribuição, recomendando-se que a cloração seja realizada em pH inferior a 8,0 e tempo de contato mínimo de 30 minutos. Recomenda-se que o teor máximo de cloro residual livre em

qualquer ponto do sistema de abastecimento, seja de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e não ultrapasse $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Como padrão de aceitação para consumo a água deve ter no máximo cor aparente de 15 uH (PORTARIA 518, 2004).

Tabela 5 - Parâmetros microbiológicos de potabilidade da água para consumo humano

Tipo de água	Variável	VMP (valor mais provável)
Água para consumo humano	<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes	Ausência em 100 mL
Água na saída do tratamento	Coliformes totais	Ausência em 100 mL
	<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes	Ausência em 100 mL
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	Coliformes totais	Sistemas que analisam mais de 40 amostras por mês: ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês. Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 mL.

Fonte: Brasil (2004)

Reconhecendo-se a limitação dos coliformes como indicadores da remoção de vírus e protozoários, bem como as limitações para a pesquisa rotineira destes patogênicos, torna-se necessário o recurso a indicadores não-biológicos complementares, a exemplo do cloro residual e da turbidez (BASTOS et al., 2001).

Os critérios reconhecidos internacionalmente como indicadores da remoção e, ou, inativação de vírus e protozoários inclui (USEPA, 1998; 1999):

- remoção/inativação conjunta, por meio da filtração-desinfecção, de 99,9% (3 log) de cistos de *Giardia*: turbidez da água filtrada inferior a 0,5 UT (2,5 log de remoção), complementada por desinfecção adequada para inativação equivalente a 0,5 log.

- inativação de 99,99% de vírus: por desinfecção adequada e a turbidez da água antes da desinfecção deve ser inferior a 0,5 UT.

- remoção de 99% de oocistos de *Cryptosporidium*, turbidez da água filtrada inferior a 0,3 UT.

Para a inativação de 0,5 log de *Giardia* o CT deve ser no mínimo de 17 mg min L^{-1} para o cloro e para o ozônio de $0,23 \text{ mg min L}^{-1}$ (USEPA, 1999).

3.6 Cloro

O cloro é o desinfetante mais utilizado em estações de tratamento de água no Brasil devido principalmente as suas vantagens quanto a custo e residual na rede de abastecimento.

O cloro oxida a membrana celular e pode causar modificações nas moléculas levando a mutações genéticas. Os derivados de cloro mais empregados como agentes desinfetantes são o hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), hipoclorito de sódio (NaOCl) e o cloro gás. Em ETAs o cloro gás é o desinfetante mais utilizado no Brasil, sendo que este quando aplicado na água tende a diminuir o pH da mesma, enquanto que os hipocloritos tendem a aumentar o pH. O cloro gás reduz a alcalinidade em 2,8 partes de cloro por parte de carbonato de cálcio e sua solubilidade diminui com o aumento da temperatura (WEF, 1996).

Quando o cloro é adicionado à água ocorre à hidrólise e a solução conterá usualmente duas formas de cloro livre: o ácido hipocloroso (HOCl) e o íon hipoclorito (OCl^-). A reação é dependente do pH e da temperatura sendo rápida e reversível. Em pH alto ($\text{pH} > 8,5$) predomina o íon hipoclorito que possui taxa de inativação menor do que o ácido hipocloroso que predomina em pH mais baixo ($\text{pH} < 6,5$). Se houver amônia na água a solução possivelmente conterá cloro combinado na forma de monocloramina, dicloramina e/ou tricloramina. Ainda se a água contiver bromo este na presença do cloro formará ácido hipobromoso (HOBr), íon hipobromito (OBr^-) e bromaminas. O cloro pode ainda reagir com outros compostos formando outras formas de cloro residual combinado (USEPA, 1984; WEF, 1996). À soma de cloro residual livre e cloro residual combinado denomina-se cloro residual total.

Por outro lado, a desinfecção com cloro pode ocasionar à formação de subprodutos. Na presença de matéria orgânica o cloro, na forma de cloro livre, pode gerar compostos tóxicos tais como os trihalometanos. O cloro reage com matéria orgânica formando compostos halogenados, ácidos haloacéticos, halocetonas e se houver bromo na água este desloca o cloro da molécula e forma compostos bromados. A formação de trihalometanos (THM) é maior em meio alcalino (pH maior que 9,4) do que em meio ácido (pH menor que 5,0) enquanto que a formação de ácidos haloacéticos (HAAs) não demonstrou uma tendência clara quanto ao pH (USEPA, 1999).

O cloro reage com muitos compostos e uma das vias é devido à sua afinidade pelo hidrogênio como, por exemplo, a reação do sulfeto de hidrogênio com cloro que pode formar enxofre (S) ou íons sulfato (SO_4^{2-}). A reação do cloro com a matéria orgânica ocorre principalmente por reações de adição e substituição, geralmente no lugar do hidrogênio. A

oxidação ocorre principalmente em sítios ricos em elétrons, tais como em compostos insaturados (duplas e triplas ligações) e compostos com anéis aromáticos nos quais, quanto maior o número de ligações OH a molécula tiver, mais reativa ela será (BEDDING et al., 1983). Por outro lado, compostos saturados e carboidratos são dificilmente oxidados pelo cloro (WEF, 1995). Hidrocarbonetos oxigenados e poliaromáticos clorados podem também ser formados pela cloração, resultando em compostos ainda mais tóxicos do que o DE que o originou (MANOLI; SÂMARA, 1999).

Itoh et al. (2000) fizeram um estudo sobre a toxicidade do cloro com ensaios “*in vitro*”. Neste estudo, a água de um lago foi coletada, filtrada e clorada com concentração de 1 mg L⁻¹; depois de 24 h o residual de cloro foi de 0,1 mg L⁻¹. Constatou-se que o efeito estrogênico da água clorada foi aproximadamente 2,3 vezes maior do que a água não clorada. As possíveis razões para o aumento da estrogenicidade foram: a cloração produziu subprodutos com atividade estrogênica ou o cloro interagiu com substâncias húmicas presentes no meio aquoso e gerou compostos com atividade estrogênica. Com isso, conclui-se que há necessidade de melhores investigações sobre a cloração e seus subprodutos, para complementar os estudos de DE nas amostras de água (ITOH et al., 2000).

Existe ampla faixa de sensibilidade ao cloro dentro dos organismos aquáticos invertebrados, uns com toxicidade aguda de 266 a 673 µg L⁻¹ e outros como a *Daphnia magna* na faixa de 17 a 45 µg L⁻¹. Para a toxicidade crônica, em duas semanas de exposição com *Daphnia magna*, a toxicidade foi de 7,5 µg L⁻¹ (USEPA, 1984). Em um teste crônico de 21 dias, em peixe, a toxicidade foi de 26 µg L⁻¹. Portanto, e de acordo com a USEPA (1984) peixes e invertebrados possuem faixa de sensibilidade próximas e plantas aquáticas possuem uma maior resistência ao cloro. Para prevenir efeitos adversos na vida aquática o nível de cloro residual deve ser menor do que 0,002 mg L⁻¹. Para isso, a descoloração de efluentes clorados se faz necessária para eliminar os efeitos tóxicos da cloração.

3.7 Ozônio

O ozônio é um potente oxidante usado no tratamento de água com potencial de oxidação de 2,07 V. Possui a vantagem de ser um eficiente desinfetante, ter maior efetividade que o cloro, menor tempo de contato que o cloro, pode controlar o sabor, odor, cor, atuar no controle de algas, melhorar a coagulação, auxiliar na oxidação: da matéria orgânica, de compostos orgânicos refratários e de poluentes inorgânicos (tais como ferro, manganês e sulfetos) (LANGLAIS et al., 1991). Como desvantagem, o ozônio é altamente corrosivo,

tóxico, tem custo relativamente alto, elevado consumo de energia, há formação de subprodutos na presença de bromo, não possui residual estável. Adicionalmente, o ozônio requer um desinfetante secundário, tal como o cloro livre ou cloraminas para manter residual no sistema de distribuição de água (USEPA, 1996). Além disso, alguns produtos da reação do ozônio com a matéria orgânica são aldeídos, cetonas, peróxido e compostos orgânicos biodegradáveis. Sendo que os compostos orgânicos biodegradáveis podem vir a servir de substrato a microrganismos e contribuir para o crescimento dos mesmos após a ozonização. (USEPA, 1999). Por outro lado, o ozônio pode ser utilizado para oxidar a matéria orgânica que potencialmente poderia gerar compostos tóxicos caso um segundo oxidante fosse utilizado para manter residual na rede de distribuição, tal como o cloro, diminuindo a formação de THM e HAAs.

De acordo com Snyder et al. (2006), a reação com contaminantes orgânicos ocorre pela ação direta do ozônio (ozônio molecular) ou pela formação de radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), reagindo rapidamente com aminas, fenóis e com compostos alifáticos. A meia vida dos radicais hidroxila é de microssegundos. Em meio ácido a principal via de oxidação é a do ozônio molecular, no entanto em meio alcalino, a exposição à radiação ultravioleta (UV) e adição de peróxido de hidrogênio, a principal via passa a ser pelos radicais hidroxila. O pH e a alcalinidade interferem na eficiência do processo. Carbonatos e bicarbonatos competem pelo radical hidroxila em altas concentrações.

O ozônio, além de ser poderoso oxidante, é importante bactericida e viricida (BIRKETT; LESTER, 2002). O ozônio inativa bactérias destruindo parcialmente ou totalmente a parede celular seguido pela lise da célula. Ozônio ataca os ácidos nucleicos pela adição de OH e H nas duplas ligações abrindo o anel aromático ou formando dímeros de timina. Sugere-se que o ozônio atua na quebra da ligação carbono-nitrogênio entre os açúcares e as bases nitrogenadas, afetando o ácido desoxirribonucleico (DNA) pela quebra das ligações de hidrogênio (WEF, 1996). O ozônio é mais eficiente na inativação de cistos de *Giardia* do que cloro, podendo o uso de ozônio potencializar a inativação destes microrganismos patogênicos.

Há alguns estudos sobre a oxidação de DE através do ozônio. Ikehata et al. (2006) concluíram que DE são geralmente degradados pela oxidação. Contudo, alguns estudos têm sugerido que o estrona é relativamente mais resistente. A estrogenicidade associada a estes compostos pode ser reduzida por ozonização e ozonização/ H_2O_2 a níveis não detectáveis (IKEHATA et al., 2006). A degradação de DE é iniciada pela hidroxilação do anel aromático altamente reativo, seguido pela abertura do anel e assim continua a degradação. O anel

fenólico hidroxilado é o componente estrutural responsável pela alta afinidade com o estrogênio receptor. Sua modificação e quebra leva à diminuição da estroгенecidade dos produtos produzidos pela ozonização (ARCAND-HOY et al., 1998² apud IKEHATA et al., 2006).

3.8 Identificação de subprodutos

Ohko et al. (2002), com 1 g L^{-1} de TiO_2/UV , degradaram 99% de 17β -estradiol após 30 min de tempo de contato e o residual de 17β -estradiol foi de $2,7\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Após três horas, todo o 17β -estradiol foi convertido a CO_2 (dióxido de carbono) e água. Contudo, ao analisar um branco, 50% do 17β -estradiol foi adsorvido pelo TiO_2 (dióxido de titânio) após uma hora na ausência de UV. Não houve aumento da estroгенecidade após a fotocatalise heterogênea e inferiu-se que foram formados os subprodutos testosterona, DEO (10e-17b-dihidroxi-1,4-estradieno-3-one) e ADO (androsta-4,16-dien-3-one), sem a confirmação de nenhum dos compostos. Pela adição do padrão de testosterona o tempo de retenção em comparação com o tempo de retenção dos subprodutos foi diferente. A porcentagem de produção destes três compostos foram 5%, 3% e 1% para o DEO, ADO e TS respectivamente. Ohko et al. (2002) também propuseram que os carbonos com maior densidade de elétrons são os carbonos C10 e C3 e depois os carbonos C2 e C5 com possibilidade de ocorrer oxidação no carbono C17 a um grupo carbonil.

Maniero et al. (2008) identificou dois intermediários propostos para a reação de oxidação pelo ozônio, 2-hidroxiestradiol e testosterona, identificados em pH 7 e 11 e em pH 3 não os identificou. O 2-hidroxiestradiol e a testosterona foram identificados com 99% e 62,5% de similaridade respectivamente, em GC/MS com as bibliotecas Nist e Wiley 275. Bila et al. (2007) também identificaram esses dois compostos após a ozonização.

Bila (2005) verificou que a atividade estrogênica do 2-hidroxiestradiol é cerca de 10 vezes menor do que o 17β -estradiol pelo ensaio Yeast Estrogen Screen (YES) e o testosterona não apresentou estroгенecidade por este ensaio.

3.9 Análise e determinação de estrógenos

São três as formas de análise dos estrogênios: *in vivo*, *in vitro* e analiticamente. Nas

² Arcand-HOY et al. Endocrine modulating substances in the environment estrogenic effects of pharmaceutical products. **International Journal toxicol.**, v. 17, n. 2, p. 139 – 158, 1998.

análises *in vitro* células ou tecidos medem a ligação do receptor, a expressão dos genes e a proliferação das células. As análises *in vitro* são ferramentas atrativas porque são rápidas, de baixo custo e geralmente reprodutíveis. As análises *in vivo* medem a toxicidade em organismos vivos, geralmente peixes são bons indicadores. As análises *in vivo* são boas, pois levam em consideração o metabolismo dos organismos e várias rotas metabólicas que *in vitro* não ocorrem, além do fato de que diferentes tecidos respondem diferentemente a cada tipo de estrogênio. A terceira forma de análise é a identificação de estrogênios no ambiente através de técnicas analíticas, quantificando os mesmo tais como por LC/MS/MS ou GC/MS (SNYDER et al., 2003).

3.9.1 Atividade Estrogênica

A atividade estrogênica pode ser definida como a capacidade de produção de respostas biológicas qualitativamente similares àquelas produzidas por um hormônio como o 17 β -estradiol. A concentração equivalente de 17 β -estradiol é a concentração de uma amostra que produz a mesma resposta que o padrão, geralmente 17 β -estradiol.

Os ensaios *in vivo* avaliam vários parâmetros, como massa de órgãos sexuais, diferenciação celular, expressão de proteínas e atividade enzimática. Os ensaios *in vitro* são baseados em mecanismos de ação que produzem respostas e utilizam pontos mais definidos do que os ensaios *in vivo* (FERREIRA, 2008). Dentre os ensaios *in vitro* têm-se os que avaliam a interação com receptores hormonais - YES - e proliferação celular – MCF-7. Os ensaios YES se baseiam em uma sequência de DNA do receptor estrogênio humano (Reh) que foi inserida no genoma de leveduras para fornecer respostas estrogênicas por meio de ensaios cromogênicos. O ensaio MCF-7 baseia-se na proliferação de culturas de células humanas cancerígenas mamárias (MCF-7) induzidas pela exposição á substância estrogênica (FERREIRA, 2008).

Dentre os ensaios *in vivo*, um é muito utilizado, o que avalia o nível de vitelogenina (VTG) no plasma dos peixes. A VTG é precursora da proteína da gema do ovo, normalmente produzida somente em fêmeas em resposta a estrogênios do ovário (uma proteína especificamente feminina) em ovíparos vertebrados. A VTG está presente em peixes fêmeas e machos, contudo sob condições normais não é expresso em machos. Todavia, quando machos são expostos a estrógenos ambientais, a vitelogenina é sintetizada no fígado e excretada no sangue. Portanto, a vitelogenina, em peixes machos tem sido usada como importante biomarcador para estrógenos ambientais no meio aquático (TABATA et al., 2003). Estes

autores demonstraram que após exposição de 5 semanas ao 17β -estradiol os peixes foram inseridos em um ambiente livre de poluição (sem a presença de 17β -estradiol) e a concentração de VTG nos peixes caiu gradualmente, contudo ressaltou que a concentração de VTG não volta aos níveis normais. Após a cloração da água com 1 a 2 mg L⁻¹ e tempo de contato de 24 horas foi observado pequeno aumento no índice somáticos de hepatócitos (HSI), contudo não se sabe se este aumento é devido ou não a formação de subprodutos clorados (TABATA et al., 2003).

Gregoraszczuk et al. (2008) avaliaram que E2 e 4-hidroxiestradiol (4OH-E2) causam significativa ação estimulante na proliferação nas células MCF-7 e que 2-hidroxiestradiol (2OH-E2), após 11 dias de exposição, apresentou efeito na proliferação de células MCF-7.

3.9.2 Quantificação de Estrógenos

A determinação de estrógenos, em amostras ambientais, requer o desenvolvimento de metodologias analíticas para a detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Os métodos analíticos publicados são frequentemente baseados em SPE e para a quantificação a cromatografias gasosa (GC) e a líquida (CLAE).

A extração em fase sólida pode ser utilizada para isolar um ou mais analitos presentes em amostras complexas, para a concentração de analitos (enriquecimento) ou isolamento da matriz – neste caso os interferentes ficam retidos no material adsorvente e o analito de interesse passa através do mesmo. No caso de hormônios, as principais finalidades do uso do SPE são o enriquecimento da amostra e o *clean-up*. As etapas envolvidas na extração em fase sólida são: condicionamento do cartucho, adição da amostra, remoção dos interferentes (*clean-up*) e eluição do analito (LANÇAS, 2004).

Frequentemente são utilizados cartuchos contendo sílica gel quimicamente ligada ao grupo apolar C18 (Octadesilsilano). Os cartuchos são seringas de polipropileno, que contém material de empacotamento entre dois discos de polietileno (LANÇAS, 2004).

Os detectores e acoplamentos de detectores mais empregados para análise de hormônios pela técnica de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) são: eletroquímico, fluorescência, espectrômetro de massas (MS) (CLAE-MS, CLAE-MS-MS), ultravioleta com varredura de diodo e ultravioleta com varredura de diodo acoplado a espectrômetro de massas.

A espectrometria de massas é um dos métodos mais comumente usados devido a sua superior sensibilidade e seletividade. O espectrômetro de massas (MS) separa e detecta um

analito baseado na razão entre a massa e a carga elétrica (m/z). O composto deve ser ionizado antes de entrar no MS. Na espectrometria de massas para a cromatografia líquida são três os tipos mais usados: ionização *eletrospray* (ESI), ionização química com pressão atmosférica (APCI) e pressão atmosférica com fotoionização (APPI) (SNYDER et al., 2003). No MS/MS um íon de transição é monitorado e um íon específico é isolado e fragmentado. Este fragmento é novamente isolado e monitorado. A técnica de MS/MS possui menor ruído, portanto é adequada para matrizes complexas (SNYDER et al., 2003).

Para a detecção por cromatografia gasosa o analito de interesse deve ser volátil e termicamente estável. Tanto o 17β -estradiol como o estrona são pouco voláteis (Tabela 3) e portanto, a detecção pela técnica de cromatografia gasosa é limitada. Para superar esta limitação a derivatização pode ser utilizada, porém possui a desvantagem de ser um trabalho extensivo e pode levar à redução na recuperação do analito (REIS FILHO et al., 2006).

3.9.3 Validação de métodos

A validação é uma das etapas mais importantes durante um estudo, pois busca a confiança em determinada metodologia por estudos envolvendo diversos parâmetros estatísticos. Uma validação pode ser distinguida por dois métodos: quando aplicada em um único laboratório (validação de um método desenvolvido localmente ou com o intuito de verificar a aplicação e confiança de determinado método previamente desenvolvido), ou quando aplicada em um estudo interlaboratorial com todas as possíveis variações aplicadas a aquela metodologia (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, dentre os órgãos que deliberam sobre validação de métodos destacam-se a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). De acordo com o INMETRO, a validação é a “Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos”. Segundo a ANVISA, “a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.”

Para realizar a validação, a metodologia deve apresentar seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão, exatidão, recuperação, robustez e estabilidade adequadas à análise. É importante que todos os equipamentos e materiais devam apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e

treinados (ANVISA, 2003).

A seletividade é a capacidade do método em diferenciar o analito de interesse das impurezas contidas na sua amostra. A seletividade garante que a resposta seja exclusivamente de um composto de interesse ou, se presentes, os interferentes não estejam em concentração a qual influencie negativamente o resultado analítico. Caso esta etapa não seja realizada corretamente a linearidade, exatidão e precisão poderão estar seriamente comprometidas (ANVISA, 2003).

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito adicionado, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Utilizou-se a metodologia dos “mínimos quadrados” para a construção da curva analítica. Nesta aproximação a variável independente (x) é a concentração, e a variável dependente (y) é a resposta do detector (ANVISA, 2003).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. A precisão pode ser avaliada quanto à repetibilidade (intra-corrida), que consiste em várias medidas de uma mesma amostra em diferentes preparações em um mesmo dia. Pode ser avaliado quanto à precisão intermediária (inter-corridas) que consiste na variação das condições dentro de um mesmo laboratório, isto é, dias diferentes ou diferentes analistas, equipamentos ou uma combinação de diferentes fatores. A reprodutibilidade é a precisão entre dois ou mais laboratórios sob condições variadas. A exatidão representa a dispersão entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência, ou seja, está relacionada com a veracidade das medidas. Assim como para a precisão existe a exatidão inter-corrida, intra-corrida e reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

A recuperação mede a capacidade de um método analítico isolar (recuperar) os analitos de interesse frente aos interferentes considerando as perdas durante o processo analítico, principalmente durante as etapas de extração e clean-up definindo-se um limite de variação aceitável (ANVISA, 2003).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o

uso normal (ANVISA, 2003).

A estabilidade é um parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado, numa dada matriz, sob condições específicas, por determinados intervalos de tempo (ANVISA, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em etapas. A primeira delas constituiu na validação do método analítico para a detecção e quantificação de estrona e de 17 β -estradiol. Após esta etapa, foram feitos os ensaios de oxidação e desinfecção com a aplicação de cloro e ozônio. Por último, a identificação dos subprodutos de estrona e 17 β -estradiol após a ozonização e cloração, que foi realizada na Espanha. É importante ressaltar que os procedimentos analíticos para quantificação dos hormônios no Brasil não estavam implementados no laboratório em que estes foram realizados. Por esse motivo, foi dedicada especial atenção à metodologia de quantificação dos hormônios.

4.1 Oxidação de 17 β -estradiol e estrona

4.1.1 Água de estudo

A água utilizada nos tratamentos foi proveniente do poço artesiano situado no campus USP - São Carlos - Área 1 antes da cloração. Após a coleta a água era armazenada a 4 °C (CETESB, 1987).

Os estrogênios selecionados para este estudo foram adicionados à água de acordo com as dosagens especificadas. Para a dissolução dos padrões na água, estes foram primeiramente dissolvidos em metanol e posteriormente adicionados à água. A caracterização da água de estudo foi realizada antes da adição dos hormônios e da cepa de *E.coli* na água. As variáveis que foram analisadas na caracterização foram: alcalinidade, condutividade, cor, carbono orgânico total (COT), *E. coli*, pH, turbidez, estrona e 17 β -estradiol. Os métodos utilizados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Métodos utilizados para a quantificação das variáveis analisadas (APHA, 2005)

Variável	Método	Equipamento	Referência
Alcalinidade	2320 B	Digmed- DM 20	APHA (2005)
Condutividade	2510	Digmed DM-31	
Cor aparente	2120 B	Hach - DR-2800	
COT	5310 B	SHIMADZU – 5000A	
pH	4500 H+	Digmed- DM 20	
Turbidez	2130 B	Hach- 2100P	

4.1.2 Cultivo, preservação, preparo e quantificação de microrganismos

Para avaliar a inativação de microrganismos foi adquirida a cepa de *E.coli* -ATCC-11229 - que foi adicionada conjuntamente com os hormônios no início de cada tratamento, sendo avaliada a sua inativação nas amostras coletadas. As cepas foram adquiridas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia – André Tosello- situada em Campinas, SP. As cepas foram recebidas em duplicata reativadas em *slants*. Para o crescimento, manutenção e preservação da cepa de *E. Coli* foi utilizado o meio Tryptic Soy Broth (TSB). O meio foi preparado com a dissolução de 30 g de TSB em 1 litro de água deionizada, aquecendo o meio até sua completa dissolução. Este era esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min.

Para a repicagem da Cepa de *E.coli* transferiu-se uma pequena porção do inóculo recebido da Fundação André Tosello para um tubo de ensaio esterilizado contendo 10 mL de TSB. O inóculo foi incubado por 24 ± 1 h a 36 ± 1 °C. Após este tempo, transferiam-se os 10 mL para um erlenmeyer contendo 90 mL de TSB com 10% de glicerol (o glicerol foi adicionado com a finalidade de preservar as células que seriam posteriormente congeladas). O erlenmeyer era então incubado durante 1,5 h a 36 ± 1 °C. Para a preservação das células, 1 mL do inóculo era transferido para um frasco previamente esterilizado e armazenado a -4 °C.

Para evitar que a matéria orgânica proveniente do ágar interferisse no tratamento da água, o meio contendo as cepas de *E.coli* era “lavado”. A solução de lavagem continha 0,9% cloreto de sódio. A “lavagem” consistia na dissolução do conteúdo de 3 frascos (cada um contendo 1 mL) em 17 mL da solução de lavagem, e seguidas diluições, fazendo-se a homogeneização após cada etapa, assim como descrito na Figura 3.

Figura 3 - Procedimento para a diminuição do teor de matéria orgânica contida no meio de cultura.

O método para a quantificação da *E. coli* foi a técnica de filtração em membranas, usando o meio Chromocult Coliform Agar da Merck. O exame consiste na filtração de 100 mL de amostras em membrana estéril de porosidade média 0,45 µm. Após a filtração a

membrana era colocada em uma placa estéril contendo o meio Chromocult Coliform Agar. A placa era então incubada a 36 ± 1 °C por 24 ± 1 h. Nessa técnica as colônias, que apresentaram coloração salmão/vermelha, são reconhecidas como coliformes totais (Figura 4) e coloração azul-escura/violeta são reconhecidas como *E.coli* (Figura 5).

Figura 4 - Identificação de coliformes totais em meio Chromocult Coliform Agar

Figura 5 - Identificação de *E. Coli* em meio Chromocult Coliform Agar

4.1.3 Desenvolvimento do método para a quantificação de 17 β -estradiol e estrona

O método analítico para a quantificação de 17 β -estradiol e estrona foi desenvolvido seguindo as normas da ANVISA (2003). O procedimento da ANVISA (2003) possui duas vertentes: a validação de métodos analíticos e a de métodos bioanalíticos. O objetivo referente aos métodos analíticos é o de demonstrar que o método é apropriado para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. No tocante a validação dos métodos bioanalíticos, estes são aplicados para a determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma, urina ou para outras matrizes biológicas.

Uma das principais características das matrizes ambientais está no fato de estas serem consideradas complexas, isto é, com vários interferentes (condição semelhante aos fluídos biológicos) representando grande interferência na determinação dos compostos de interesse. Outro fator importante a ser considerado, na maioria dos casos envolvendo a detecção de contaminantes presentes nas matrizes ambientais, é que os compostos estão em níveis residuais ou traços. Devido a estas duas características (matriz e pequena concentração dos compostos de interesse), optou-se por focar neste trabalho na validação de Métodos Bioanalíticos.

A metodologia para a identificação destes compostos foi desenvolvida em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. A validação do método foi feita de acordo com os seguintes parâmetros: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, exatidão, precisão e recuperação.

Para avaliar a seletividade comparou-se a matriz (água do poço da USP) isenta da substância de interesse após passar por toda a metodologia com o padrão analítico, estrona com 99,9% de pureza e 17 β -estradiol – Sigma Reference Standard, diluído em um solvente, que neste caso foi acetonitrila (ACN).

O LD foi determinado por adições decrescentes do analito até que este, após ser submetido aos procedimentos metodológicos, possa ser detectado. Esta detecção é recomendada pela ANVISA (2003) como sendo uma resposta analítica (pico cromatográfico) cuja altura seja 2 a 3 vezes a amplitude do sinal do ruído.

Segundo a presente metodologia (ANVISA, 2003), o limite de quantificação é denominado como limite inferior de quantificação (LIQ), pois deve ser estabelecido por meio da análise contendo concentrações decrescentes do analito de interesse até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O LQ foi determinado da mesma forma que o LD, assumindo-se no mínimo 5 vezes a amplitude do sinal ruído. No entanto, para que este último possa ser considerado, o método deve ser preciso e exato nesta concentração. A fim de se obter esta informação, analisaram-se, depois de passar por toda a metodologia, 5 repetições da matriz dopada com os analitos na concentração referente ao LQ.

A linearidade foi estudada através da curva analítica em meio aquoso, isto é as concentrações desejadas dos analitos de interesse (padrões analíticos) foram adicionados à matriz e submetidos à metodologia. Após toda a metodologia os extratos foram analisados e a curva foi plotada utilizando-se seis concentrações dos analitos de interesse. Cada uma destas seis soluções foi analisada em triplicata, sendo que a curva analítica foi contruída 3 vezes.

De acordo com a ANVISA (2003), a curva analítica deve contemplar o limite de variação esperado da amostra, devendo incluir o LQ e até 120% da maior concentração esperada. Para aceitação da curva analítica a exatidão deve ser maior ou igual a 80% e menor ou igual a 120% para o LQ e maior ou igual a 85% e menor ou igual a 115% para as outras concentrações da curva de calibração, sendo que no mínimo quatro das seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com estes critérios, incluindo-se nestas quatro, o LQ e a maior concentração da curva de calibração. O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

A precisão e exatidão da metodologia foram determinadas por escolha de três soluções

de diferentes concentrações (denominadas baixa, média e alta) e cada uma destas analisadas em quintuplicata (de todo o processo metodológico), sendo realizadas em uma mesma corrida (precisão intra-dias) e em dias diferentes (precisão inter-dias).

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), sendo que, segundo a ANVISA (2003), não se admitem valores superiores a 15%, exceto para o LQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20% (Equação 1).

$$CV = \frac{DP}{CD} \times 100 \quad (1)$$

CV: Coeficiente de variação; DP: Desvio Padrão; CD: Concentração Determinada experimentalmente

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente não se admitindo valores menores ou iguais a 85% e superiores ou iguais a 115%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores maiores ou iguais a 80% ou menores ou iguais a 120% (Equação 2).

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (2)$$

A recuperação foi realizada comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir das soluções de três diferentes concentrações (tidas como baixa, média e alta) com amostras não extraídas, diluídas em ACN (Figura 6). As porcentagens de recuperação do analito devem ser próximas a 100%. Porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (Equação 3).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Padrão Extraído}}{\text{Padrão não Extraído}} \times 100 \quad (3)$$

Figura 6 - Exemplo de como a recuperação do analito foi realizada para as diferentes amostras

As concentrações baixa, média e alta foram definidas de acordo com os seguintes critérios:

Concentração Baixa: mesma concentração de LQ.

Concentração Alta: de 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

Concentração Média: a média entre as concentrações baixa e alta.

Em se tratando de análise das amostras reais pelo método validado segundo a RE nº 899 (ANVISA, 2003), utilizam-se os CQs (Controles de qualidade) como base para a aceitação ou rejeição da corrida analítica. Estes CQs são matrizes fortificadas em concentrações dos analitos de interesse exatamente conhecidas e estabelecidas através da referida norma, bem como a quantidade destes CQs.

A utilização de CQs é muito eficiente, pois, dentro de uma mesma corrida consegue-se identificar todos e quaisquer problemas com as amostras ambientais os quais são passíveis de ocorrerem desde a coleta até a sua análise.

Na análise das amostras, para a aceitação da corrida analítica, utilizaram-se portanto, tais controles de qualidades. Para isso amostras da água do poço da USP foram dopadas na concentração desejada de estrona e/ou 17 β -estradiol e, juntamente com as outras amostras, eram extraídas e quantificadas de acordo com a metodologia utilizada. No mínimo, em cada lote de amostras a ser analisado, eram feitos 3 CQs: com a concentração do LQ, na concentração média e com concentração próxima ao limite superior da curva de calibração.

4.1.4 Metodologia de extração

Para a extração dos hormônios das amostras de água foi empregado o método de extração em fase sólida em coluna C18 (500 mg, 5 ml da Agilent) (Figura 7). A extração foi realizada em manifold (Figura 8) de acordo com Ternes et al. (1999b), fazendo-se as seguintes alterações: volume de amostra de 200 mL sem ajuste de pH, secagem do cartucho por meio do vácuo proporcionado pelo sistema manifold conectado a uma bomba de vácuo por dez minutos e ressuspensão das amostras com 500 μ L de acetonitrila.

Figura 7 - Extração em fase sólida (SPE)

Figura 8 - Manifold a vácuo

4.1.4.1 Condições de extração

1^a etapa: condicionamento do adsorvente C18

- 6 mL de hexano; 2 mL de acetona; 6 mL de metanol; 10 mL de água deionizada em pH 3 (ajustado com ácido clorídrico).

2^a etapa: amostra

- passagem de 200 mL da amostra

3^a etapa: *clean-up*

- 10 mL de uma solução de metanol e água deionizada na proporção de 1:9 respectivamente.

- secagem da amostra por 10 min, deixando a bomba ligada no manifold com as amostras.

4^a etapa: eluição do analito de interesse

- 4 mL de acetona

Após a extração, o volume eluído foi seco em um fluxo de nitrogênio e o analito ressuspendido em 500 µL de acetonitrila.

4.1.5 Quantificação dos hormônios por cromatografia líquida acoplada ao detector de fluorescência

A análise dos hormônios foi feita por CLAE com detector de fluorescência. A coluna utilizada foi a C18-PAH (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). As condições utilizadas estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições utilizadas no CLAE-FLU para a quantificação dos analitos

Composto	Fase móvel ACN:H ₂ O	Excitação (nm)	Emissão (nm)	T (°C)	Volume de injeção (μL)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Tempo total (min)
17β-estradiol Sem extração*	60:40	230	306	25	20	1	10
17β-estradiol Com extração **	48:52	230	306	25	20	1	10
Estrona ***	55:45	230	310	25	20	1	10

* LQ de 1 μg L⁻¹; **LQ de 50 ng L⁻¹; ACN: acetonitrila; *** LQ de 1,5 μg L⁻¹

Amostras com concentrações abaixo do limite de quantificação, mas dentro do limite de detecção, foram fortificadas para que pudessem ser analisadas, isto é, uma quantidade conhecida do analito foi adicionada à amostra e, então, o analito tornou-se passível de ser quantificado pelo método. A diferença entre a quantidade obtida e a quantidade do analito adicionada é a quantidade original do analito na amostra. As amostras fortificadas foram extraídas conforme a metodologia descrita anteriormente.

4.1.6 Ensaios de oxidação com cloro

Os ensaios com cloro foram realizados em batelada, utilizando béqueres de 2 litros sob agitação em um aparelho de jar-teste com um gradiente de 60 s⁻¹ (Figura 9). Toda a água utilizada nesta parte do experimento foi filtrada em membrana com porosidade de 0,45 μm de mistura de ésteres com intuito de eliminar possíveis sólidos em suspensão na amostra. O desinfetante utilizado foi o hipoclorito de sódio (NaOCl). Para a quantificação do cloro livre e cloro total foi utilizado o método DPD (N,N-dietil-p-fenileno diamina) – espectrométrico - 4500-CL G (APHA, 2005).

Figura 9 - Jar-test utilizado para a mistura dos hormônios durante a oxidação

Foram realizados tratamentos preliminares para analisar se ocorreria influência na remoção dos hormônios na presença de *E.coli* em concentrações elevadas e avaliar o comportamento da demanda de cloro. Os testes preliminares foram realizados com a dose de cloro de $1 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ e tempo de contato de 30 minutos considerando o regime de mistura completa.

Cada tratamento foi repetido três vezes e cada amostra foi analisada de 2 a 3 vezes. Todos os ensaios foram realizados de acordo com o exposto a seguir:

- Foram colocados 2 L de amostra de água em cada béquer (3 repetições).
- Verificação da concentração de cloro na solução estoque
- Ajuste do gradiente de velocidade do jar-teste para 60 s^{-1}
- Medição da temperatura
- Transferência da quantidade desejada do hormônio em cada béquer. Uma amostra desta água era separada para posterior análise de alcalinidade, cor, condutividade, turbidez e hormônios.
- Transferência das cepas de *E. coli*
- Após 1 min de mistura coletou-se 150 mL de cada repetição colocando-as em um mesmo recipiente, constituindo análise composta, para quantificação bacteriológica e COT.
- Adição da dosagem desejada de cloro.
- Após o tempo de contato estabelecido, foram feitas as coletas de cada frasco para quantificação da concentração de cloro residual.
- Após as coletas para a análise do cloro residual foi adicionado metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) em excesso em cada béquer para eliminar o residual de cloro.
- Ao final de cada tratamento foram realizadas as seguintes análises: alcalinidade, cor, condutividade, COT, turbidez, estrona, 17β -estradiol, residual de cloro e *E.coli* - análises individuais de cada béquer.

Como a concentração do cloro na solução de dosagem altera com a temperatura e com as condições do ensaio, antes do mesmo era realizada a calibração da dosagem aplicada de cloro. A calibração era realizada sob as mesmas condições, no entanto, utilizando água destilada simulava-se a aplicação de cloro na concentração desejada e verificava-se a concentração de cloro residual imediatamente após a aplicação do mesmo. Ajustava-se então a concentração de cloro aplicada em cada ensaio.

4.1.6.1 Ensaios de oxidação de estrona pelo cloro

As condições dos ensaios de oxidação da solução contendo estrona estão apresentados na Tabela 8. Estes ensaios foram feitos com 3 repetições e com concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 8 - Condições aplicadas na oxidação do estrona

Dosagem de cloro ($\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$)	Tempo (min)
1	10
	30
2	10
	30
6,4	30

Após estes tratamentos foi feito um tratamento com 2 mg L^{-1} de cloro, concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de estrona, as alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 1, 4, 8, 12 e 24 horas para avaliar a remoção de estrona ao longo do tempo.

4.1.6.2 Ensaios de oxidação do 17β -estradiol pelo cloro

As condições dos ensaios de oxidação da solução contendo 17β -estradiol estão apresentadas na Tabela 9.

Após estes tratamentos foi feito um tratamento com 2 mg L^{-1} de cloro, concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol, as alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 1, 4, 8, 12 e 24 horas para avaliar a remoção ao longo do tempo.

Tabela 9 - Condições dos ensaios de oxidação do 17 β -estradiol com o cloro

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo (min)	Dosagem de cloro ($\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$)
100	30	0,5
1	30	
100	10	
1	10	
0,1	10	
300	30	1
100	30	
1	30	
1	20	
300	10	
100	10	
1	10	
100	1	2
100	4	
100	7	
100	10	
1	10	
1	20	
100	30	
1	30	
100	30	5

4.1.6.3 Ensaio de toxicidade crônica e efeito estrogênico em peixes

Com o intuito de avaliar o efeito crônico que as amostras cloradas teriam, elaborou-se um experimento ecotoxicológico baseado na norma da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2007). O objetivo foi avaliar o efeito de amostras contendo o hormônio 17 β -estradiol após a cloração na produção da proteína VTG, em peixes machos e fêmeas submetidos às mesmas condições.

Foram adquiridos peixes da espécie *Danio rerio* (Paulistinha), que é uma espécie reconhecida internacionalmente e padronizada em ensaios ecotoxicológicos, para a realização dos testes. Os peixes foram dispostos nos aquários do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Química da USP e adaptados durante um mês para posterior montagem dos experimentos (Figura 10).

Figura 10 - Foto do tanque de adaptação dos peixes *Danio rerio*

Os ensaios foram feitos em triplicata. Em cada unidade experimental foram colocados 3 peixes machos e 3 peixes fêmeas portanto, um total de 9 machos e 9 fêmeas (Figura 11A e 11B). Foram realizados 6 controles, como descrito na Tabela 10; 3 controles negativos - somente água de reconstituição, controle do solvente que neste caso foi metanol e somente cloro sem hormônio e três controles positivos, com $50 \mu\text{g L}^{-1}$, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Dois tipos de tratamentos diferentes foram testados com duas concentrações iniciais distintas de E2, concentração inicial de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e 100 ng L^{-1} . As amostras foram tratadas, como especificado na Tabela 10, e diluídas com a água de reconstituição nas seguintes proporções: 100% de água tratada, 75% de água tratada, 50% de água tratada e 25% de água tratada, para se avaliar o efeito da diluição da mesma.

Figura 11 - (A) Todo experimento ecotoxicológico montado (B) Unidade experimental

A duração total do ensaio foi de 21 dias, o volume de amostra em cada unidade experimental foi de 1 L, as amostras foram preparadas todos os dias de acordo com o exposto na Tabela 10. As amostras foram preparadas com a água do poço da USP, adicionando a quantidade de E2 necessário em cada ensaio, isto é 100 ng L^{-1} ou $1 \mu\text{g L}^{-1}$, posteriormente

aplicava-se a dose de cloro desejada deixando reagir durante o tempo de contato desejado. Após o tempo de contato, aplicava-se metabissulfito de sódio para eliminar o residual de cloro (em todos os ensaios a mesma concentração de metabissulfito de sódio foi adicionada). A água era então trocada e os peixes alimentados, quando a porcentagem de água tratada era menor que 100%, completava-se a amostra com água de reconstituição. A água de reconstituição é uma água que constitui de água deionizada preparada com 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2. Sendo que a solução 1 consistia de: $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1,5 g em 1 L de água deionizada e a solução 2 consistia de: KCl - 0,2 g, NaHCO_3 - 4,8 g e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 6,1 g em 1 L de água deionizada.

O ensaio foi do tipo semi-estático, com renovação total do volume a cada 24 h. A alimentação (tetra min®) foi administrada diariamente e o foto período estabilizado e controlado em 12 h/12 h. A temperatura foi mantida em $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e a aeração feita através de bombas de aquário. O pH e o oxigênio dissolvido (OD) foram controlados semanalmente a fim de se obter homogeneidade nos ensaios e verificar as condições ambientais.

Tabela 10 - Descrição dos ensaios de ecotoxicidade

Ensaios	Cloro aplicado (mg L^{-1})	Tempo de contato (min)	Concentração inicial de E2
Controle da água de reconstituição			
Controle do cloro	2	30	
Controle do solvente (meOH)			
Controle E2			$50 \mu\text{g L}^{-1}$
Sem tratamento Inicial - $1 \mu\text{g L}^{-1}$			$1 \mu\text{g L}^{-1}$
$1 \mu\text{g L}^{-1}$ - 25% de água tratada	2	30	$1 \mu\text{g L}^{-1}$
$1 \mu\text{g L}^{-1}$ - 50% de água tratada	2	30	$1 \mu\text{g L}^{-1}$
$1 \mu\text{g L}^{-1}$ - 75% de água tratada	2	30	$1 \mu\text{g L}^{-1}$
$1 \mu\text{g L}^{-1}$ - 100% de água tratada	2	30	$1 \mu\text{g L}^{-1}$
Sem tratamento Inicial - 100 ng L^{-1}			100 ng L^{-1}
100 ng L^{-1} - 25% de água tratada	2	30	100 ng L^{-1}
100 ng L^{-1} - 50% de água tratada	2	30	100 ng L^{-1}
100 ng L^{-1} - 75% de água tratada	2	30	100 ng L^{-1}
100 ng L^{-1} - 100% de água tratada	2	30	100 ng L^{-1}

Após os 21 dias, os peixes foram anestesiados com benzocaína, separados em machos e fêmeas, embalados, etiquetados e refrigerados a -4°C . Os peixes foram então descongelados, pesados de acordo com os grupos (machos e fêmeas) e contabilizados devido a possíveis perdas durante o ensaio ecotoxicológico (morte).

Os grupos foram então preparados para a quantificação da proteína VTG nas

diferentes amostras. Para isso, os peixes foram dispostos em béqueres com uma solução tampão na proporção de 1:2 massa/volume, isto é, cada 1 g de peixe adicionava-se 2 mL do tampão. O tampão constituía de: NaCl - 4 g, KCl - 100 mg, Na₂HPO₄ - 700 mg, KH₂PO₄ - 95 mg, Aprotinina - 50 µL e BSA (albumina sérica bovina) - 5 g em 500 mL de água deionizada. Os peixes foram então maseados, homogeneizados e transferidos para um tubo da centrífuga (Figura 12) (FILHO, 2008).

As amostras foram centrifugadas durante 45 min a 4000 rpm (Centrífuga modelo 5810 - Eppendorf), após este tempo, o líquido sobrenadante foi retirado (Figura 13) e transferido para eppendorfs e congelados até a análise no kit de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (FILHO, 2008).

Figura 12 - Amostra de peixe maseado

Figura 13 - Amostra de peixe maseado após centrifugação

As amostras foram analisadas no kit ELISA para a quantificação da proteína VTG em peixes da espécie *Danio rerio*, da empresa biosense® com 96 poços. A análise procedeu-se como se segue:

- Diluição do padrão (vtg mL⁻¹) nas seguintes proporções: 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,997; 0,48; 0,24; 0,12 ng vtg mL⁻¹.
- Diluição das amostras dos extratos dos peixes de acordo com as recomendações do kit. Os peixes machos foram diluídos 1:500, ou sem diluição, e os peixes fêmeas 1: 1800 000.
- Adição de 100 µL de amostras nas microplacas, as amostras foram analisadas em duplicatas.
- Incubou-se as amostras por uma hora a temperatura de 20 a 25 °C.
- Após o tempo determinado lavar os poços três vezes com 300 µL da solução de lavagem por vez e adicionar 100 µL em cada poço do primeiro anticorpo.
- Incubar as amostras por uma hora a temperatura de 20 a 25 °C, lavar os poços três

vezes com 300 μL da solução de lavagem por vez e adicionar 100 μL do segundo anticorpo.

- Incubar por uma hora as amostras a temperatura de 20 a 25 $^{\circ}\text{C}$, lavar os poços três vezes com 300 μL da solução de lavagem por vez e adicionar 100 μL da solução substrato.

- Incubar por 30 min a temperatura de 20 a 25 $^{\circ}\text{C}$ no escuro.

- Após o tempo determinado adicionar 50 μL de ácido sulfúrico a 2M para parar a reação.

- Aguardar por 5 min e ler a absorvância a 492 nm em uma leitora de placas.

4.1.7 Ensaios de oxidação com ozônio

Os ensaios de oxidação com ozônio foram realizados em unidade experimental, em escala piloto, construída no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas (LATAR). A coluna de ozonização foi construída com tubo de PVC marrom com 110 mm de diâmetro, altura total de 3,5 m e altura útil de trabalho de 3,0 m, que foi determinada por um extravasor (Figura 14). O volume útil do reator era de 28,5 L. Os ensaios foram realizados em batelada.

Figura 14 - Coluna para a ozonização

O gerador de ozônio utilizado, modelo PZ 7 da EAGLESAT®, é composto por uma

unidade geradora de oxigênio (método PSA- *Pressure Swing Adsorption*), um compressor e o gerador de ozônio, sendo este do tipo descarga corona (Figura 15). A produção de ozônio pelo gerador foi medida empregando-se o analisador de ozônio na fase gasosa IN USA Incorporated (Figura 16), acoplado ao rotômetro.

O ozônio foi aplicado na base no reator utilizando difusor poroso. O *off-gas*, a quantidade de ozônio gasoso que não se transfere para o meio líquido, foi capturado por um frasco lavador (Figura 17) preenchido com solução de iodeto de potássio (KI) a 2%. Este procedimento visa à quantificação do *off-gas* (Método Iodométrico – APHA, 2005) e à eliminação do ozônio, de modo que este não seja liberado para a atmosfera, uma vez que o ozônio é tóxico.

Figura 15 - Gerador de ozônio

Figura 16 - Analisador de ozônio

Para verificar se os equipamentos: gerador de ozônio, rotômetro (Figura 18) e analisador de ozônio em fase gasosa estavam calibrados, foi realizado uma comparação com o método iodométrico (APHA, 2005).

Figura 17 - Frasco lavador do off-gás

Figura 18 - Rotâmetro

A quantificação do ozônio residual no líquido foi obtida pelo método espectrométrico Índigo 4500 B de acordo com a APHA (2005).

A água era preparada pela adição do hormônio na concentração desejada e da cepa de *E.coli*. Posteriormente a coluna era preenchida, com a água dopada de hormônio, por um sistema moto-bomba pela parte de cima. Retirava-se uma alíquota de água através do extravasor de água após a coluna estar totalmente preenchida, para a análise de E1, E2, cor, *E.coli*, turbidez, pH e condutividade (Tabela 6). Depois de preenchida a coluna, iniciava-se o tratamento com a dosagem desejada de ozônio. Ao se concluir o ensaio o off-gás e a concentração de ozônio na fase líquida eram quantificados. O ozônio consumido foi calculado de acordo com a equação (5).

$$OC = OA - OF - OR \quad (5)$$

OC: ozônio consumido (mg L^{-1}), OA: ozônio aplicado (mg L^{-1}), OF: ozônio no off-gas (mg L^{-1}), OR: ozônio residual na fase líquida (mg L^{-1})

A concentração referente ao off-gas foi calculada pela razão entre a massa de ozônio no off-gas, retida no frasco com solução de iodeto de potássio, e o volume de água no reator. Na Tabela 11 e 12 estão relacionados os ensaios realizados.

Cada tratamento foi realizado 2 vezes e cada amostra analisada de 2 a 3 vezes. Ao final de cada tratamento foram realizadas as seguintes análises: estrona, 17β -estradiol, cor, quantificado o residual de ozônio, *E.coli*, turbidez, pH e condutividade com métodos descritos na Tabela 6.

4.1.7.1 Ensaios de oxidação do 17 β -estradiol com ozônio

Todos os ensaios foram realizados no Brasil e a extração e quantificação foram feitas de acordo com o item 4.1.4 e 4.1.5. As condições para a realização dos ensaios estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições dos ensaios realizados para oxidação de 17 β -Estradiol com ozônio

Concentração inicial 17 β -Estradiol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ozônio aplicado ($\text{mg O}_3 \text{ L}^{-1}$)	Tempo de contato (min)
0,1	0,95	1
100	0,62	1
100	0,77	1
100	0,25	5
100	0,29	5
0,5	2,06	5
0,5	2,02	5
1,0	0,57	5
1,0	0,56	5
1,0	5,05	5
100	4,05	5
100	12,23	15
100	22,80	30
100	16,80	30

4.1.7.2 Ensaios de oxidação do estrona com ozônio

Todos os ensaios foram realizados no Brasil e a extração e quantificação foram feitas de acordo com o item 4.1.4 e 4.1.5. No entanto, vale ressaltar que devido a se ter limite de quantificação elevado - 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ - para o estrona no equipamento com HPLC-FLU, as amostras também foram analisadas na Espanha. O equipamento e condições da quantificação estão descritos no item 4.2.2.6. Na Tabela 12 estão apresentadas as condições para realização dos ensaios.

Tabela 12 - Condições dos ensaios realizados para oxidação de estrona com ozônio

Concentração inicial estrona ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ozônio aplicado ($\text{mg O}_3 \text{ L}^{-1}$)	Tempo de contato (min)
100	0,42	1
100	1,50	5
100	15,6	30
100	1,11	1
100	4,42	5
100	12,15	15
100	27,6	30

4.2 Identificação dos subprodutos da oxidação do estrona e 17 β -estradiol

A parte referente à oxidação dos hormônios (estrona e 17 β -estradiol) foi realizada no Brasil, no entanto a parte referente à identificação e a quantificação dos subprodutos foi realizada na Espanha, como requisito para o doutorado sanduíche. A pesquisa foi realizada no Departamento de Química Ambiental do Instituto de Diagnostico Ambiental e Estudos da Água (IDAEA) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), situado na cidade de Barcelona, na Espanha.

Devido ao fato de esta parte do trabalho ter sido realizada na Espanha seguiram-se as regras e normas utilizadas por este grupo. Para a validação parcial qualitativa e quantitativa dos compostos seguiu-se a da Directiva 2002/657/EC (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002).

4.2.1 Identificação dos subprodutos da oxidação do estrona e 17 β -estradiol utilizando ozônio

Vale ressaltar, que todos os ensaios de oxidação de hormônios foram feitos no Brasil, de acordo com os itens 4.1.1, 4.1.4 e 4.1.7.

4.2.1.1 Reagentes e soluções

Todos os solventes utilizados foram grau HPLC e os padrões 17 β -estradiol, estrona, estriol, 6 α -hidroxiestradiol, 4-hidroxiestradiol e 2-hidroxiestradiol foram da Sigma Aldrich. Todas as concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque, diluindo-se cada padrão em solução de metanol.

4.2.1.2 Preparação das amostras

Ainda no Brasil, as amostras foram extraídas empregado o método de SPE em coluna com material adsorvente C18 (Accubond, 500 mg) da Agilent Technologies. A extração foi realizada como descrito no item 4.1.4.1 com uma modificação na 3ª e na 5ª etapa, como descrito abaixo. O volume de água extraído em cada cartucho foi de 200 mL sendo a extração realizada em manifold.

1ª etapa - condicionamento do adsorvente C18: 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol, 10 mL de água deionizada em pH 3 (ajustado com ácido clorídrico)

2^a etapa- aplicação da amostra: passagem de 200 mL da amostra

3^a etapa- clean-up: 10 mL de água deionizada.

Após a extração o volume eluído foi seco em um fluxo de nitrogênio durante 30 min, os cartuchos foram então congelados e transportados para a Espanha devidamente preservados em gelo seco. Na Espanha prosseguiu-se com o procedimento de extração:

4^a etapa- eluição do analito de interesse: 4 mL de acetona

5^a etapa- ressuspensão dos analitos em 500 µL de metanol.

O tempo entre a análise dos subprodutos do estrona e do 17β-estradiol e os ensaios de oxidação foi de no máximo 3 meses. Para verificar se não havia ocorrido degradação dos compostos nas amostras, foram feitas comparações entre as concentrações das amostras analisadas no Brasil e a concentração das mesmas amostras posteriormente analisadas na Espanha, isto para os compostos estrona e 17β-estradiol. Este procedimento pode verificar que as amostras não sofreram modificações durante o período de estocagem e transporte, podendo portanto, serem utilizadas.

4.2.1.3 Identificação de subprodutos

Os experimentos para a identificação dos subprodutos de E2 e E1 foram feitos com concentração inicial distinta ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ e 100 ng L^{-1}), separadamente para cada hormônio. As amostras com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foram feitas primeiro, com o objetivo de identificar os principais subprodutos com uma concentração inicial elevada dos compostos. Depois de identificados, foram analisadas as amostras com 100 ng L^{-1} , com o intuito de verificar e confirmar a formação dos subprodutos, mesmo com concentração inicial de hormônio baixa, o que se aproxima mais das concentrações encontradas em amostras superficiais reais, isto é, na ordem de ng L^{-1} . A dose de ozônio aplicada variou de 0,4 a 28 mg L^{-1} , a temperatura da água nos experimentos foi de $19 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e o pH variou de $7,0 \pm 0,3$ no início dos tratamentos. Na Tabela 13 estão apresentadas as condições para se obter as amostras que foram analisadas.

Tabela 13 - Descrição dos ensaios realizados para a identificação dos subprodutos formados

Composto	Concentração inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ozônio aplicado (mg L^{-1})	Tempo de contato (min)
E2	100	0,62	1
	100	0,25	5
	100	4,05	5
	100	12,23	15
	100	22,80	30
	100	16,80	30
	0,1	0,44	1
	0,1	0,95	1
	0,1	4,2	5
	0,1	11,2	15
	0,1	15,9	30
	0,1	20,9	30
E1	100	0,42	1
	100	15,6	30
	100	1,11	1
	100	4,42	5
	100	12,15	15
	100	27,6	30
	0,1	0,81	1
	0,1	3,77	5
	0,1	10,09	15
	0,1	23,46	30
	0,1	0,54	1
	0,1	13,49	30

4.2.1.4 Identificação dos subprodutos por UPLC-QqToF-MS/MS

A identificação dos subprodutos de estrona e 17β -estradiol, nas amostras extraídas com concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, foram realizados em um equipamento UPLC-QqTOF-MS/MS da Waters Acquity com sistema UPLC (Waters Corp., Mildford, EUA), equipado com um sistema de bomba binária e com injeção automática ligado ao detector Waters QqToF-Micro MS/MS. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Hibar HR Purospher STAR RP-18 (30 x 2,1 mm, 2 μm - tamanho da partícula) da Merck (Darmstadt, Alemanha). A temperatura na coluna foi mantida em 35°C e a temperatura no compartimento das amostras foi mantida em 10°C . O volume de injeção foi de 5 μL com o fluxo da fase móvel de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. A fase móvel consistiu em A (ACN) e B (água) e os valores do gradiente utilizado para a separação dos analitos durante a corrida cromatográfica estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Gradiente da fase móvel utilizado durante a corrida cromatográfica

Tempo (min)	% A(ACN)	%B (água)
0	10	90
2	10	90
4	25	75
5	25	75
6	50	50
8	50	50
10	100	0
11	100	0
12	10	90

A detecção foi realizada com fonte de eletrospray (ESI) com ionização em modo negativo (NI), a voltagem do capilar foi de 2800 V com a voltagem no cono variando de 10 a 50 V. O gás de nebulização foi nitrogênio (500 L h⁻¹) com uma temperatura de 450 °C; o gás do cono (nitrogênio) foi mantido em 30 L h⁻¹ e a temperatura da fonte em 150 °C.

Para os experimentos em MS o instrumento foi operado em modo scan, passando pelo primeiro quadrupolo aplicando uma baixa energia de colisão (4 eV), sendo os dados coletados no TOF com um m/z de 50 até 600. Os experimentos com MS/MS foram feitos com energia de colisão (CE) variando de 10-50 eV. Todas as análises foram realizadas usando uma referência interna para garantir a exatidão e a precisão dos resultados. A referência interna usada para a calibração da massa exata foi Val-Tyr-Val (m/z 380,2029).

O controle do instrumento, aquisição e avaliação dos dados foram feitos com uso do software MassLynx V4.1 (Waters Corp.). Este software (Waters Corp.) calcula todas as possíveis fórmulas de compostos desconhecidos (composição elementar) através da massa exata adquirida pelo equipamento. Vindo a ser importante ferramenta para identificar e propor possíveis estruturas desses compostos. Para a identificação final dos subprodutos foram feitos experimentos em MS/MS para a medida da massa exata dos fragmentos gerados pelo íon pai.

4.2.1.5 Identificação dos subprodutos da oxidação por UPLC-QqQ-MS/MS

A análise dos subprodutos previamente identificados foi realizada em amostras ozonizadas com concentração inicial de 100 ng L⁻¹ de E1 e E2. O equipamento utilizado foi UPLC-QqQ-MS/MS da Waters Acquity com sistema UPLC ligado ao detector da Waters TQD MS/MS. As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item 4.2.1.4, exceto o volume injetado que, neste caso, foi de 8 µL para aumentar a sensibilidade do equipamento. A detecção em MS/MS foi realizada no modo de selected reaction monitoring (SRM), usando eletrospray em modo negativo, basicamente as mesmas condições utilizadas

no item 4.2.1.3, isto é: voltagem do capilar 2800 V, vazão do gás de nebulização 650 L h⁻¹, temperatura de desolvatação 450 °C, vazão do gás do cono 30 L h⁻¹ e temperatura da fonte 150 °C.

A otimização das condições para a identificação dos subprodutos foi feita com as amostras dos experimentos realizados anteriormente (alta concentração inicial de estrona e 17β-estradiol). O controle do instrumento, aquisição e avaliação dos dados foi realizado com uso do software MassLynx V4.1 (Waters Corp.)

4.2.2 Identificação dos subprodutos da oxidação do estrona e 17β-estradiol utilizando cloro

Esta parte da pesquisa foi feita integralmente na Espanha (verificar fluxograma da Figura 19).

4.2.2.1 Reagentes e soluções

Todos os solventes utilizados foram grau HPLC e os padrões 17β-estradiol, estrona, foram da Sigma Aldrich. Os padrões internos, estrona 2, 4, 16, 16 -d4 e 17β-estradiol- 2, 4, 16, 16, 17 -d5 foram adquiridos na CDN-Isotopes. Todas as concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque, diluindo-se cada padrão em solução de metanol.

Água utilizada para cromatografia - HPLC ou deionizada foi utilizada para a realização dos ensaios. A solução de hipoclorito de sódio, Sigma Aldrich, continha concentração de cloro disponível ≥ 4%. Tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) foi adicionado após cada tratamento, ou alíquota retirada, a fim de eliminar o residual de cloro das amostras.

4.2.2.2 Descrição dos ensaios com cloro

Os ensaios com cloro foram feitos em batelada utilizando béqueres de 2 litros sob agitação. O desinfetante utilizado foi o hipoclorito de sódio (NaOCl). Para a quantificação do cloro total foi utilizado o método DPD – espectrométrico - 4500-CL G, adaptado (APHA, 1998).

Como a concentração do cloro na solução de dosagem se altera com a temperatura e com as condições do ensaio, antes do mesmo era realizada a calibração da dosagem aplicada de cloro, a qual era realizada sob as mesmas condições, isto é, temperatura e pH, no entanto,

utilizando água utilizada para cromatografia HPLC. Simulava-se a aplicação de cloro na dosagem desejada e determinava-se a concentração de cloro residual imediatamente após a aplicação do mesmo. Ajustava-se, então, a dosagem de cloro aplicada em cada ensaio.

Os experimentos foram divididos em duas partes: a primeira, com concentração inicial de estrona e 17 β -estradiol de 10 mg L⁻¹, para identificar os subprodutos formados (tratamento A e B Tabela 15), e a segunda, com a concentração inicial de 500 ng L⁻¹, na tentativa de identificar os subprodutos encontrados mesmo com concentração inicial de hormônio baixa, mais próxima do que é encontrado no ambiente (tratamento C e D, Tabela 15). A dose de cloro aplicada foi de 1,5 mg L⁻¹ para as concentrações iniciais de hormônio baixas e 5,0 mg L⁻¹ para as concentrações iniciais de hormônio altas. A temperatura variou de 20 a 24 °C e o pH da água entre 6,0-7,0.

Durante os ensaios, alíquotas eram retiradas de tempos em tempos adicionando-se tiosulfato de sódio a elas. Uma parte das amostras foi conservada (sem tiosulfato de sódio) para a quantificação de cloro total pelo método DPD (APHA, 2005).

Tabela 15 - Descrição dos ensaios de oxidação utilizando o cloro

Tratamento	Composto	Concentração inicial	Dosagem de cloro	Tempo de contato
A	E1	10 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	24 h
B	E2	10 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	24 h
C	E1	500 ng L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹	16 dias
D	E2	500 ng L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹	16 dias

Na Tabela 16 está apresentado o resumo das técnicas e equipamentos utilizados para cada experimento realizado. As diferentes técnicas de extração e equipamentos utilizados decorreram da adequação dos limites de detecção que atendessem aos objetivos da pesquisa.

Tabela 16 - Condições utilizadas para a análise qualitativa e quantitativa dos compostos de interesse

Tratamento	Composto	Concentração inicial de hormônio *	Extração	Equipamento
A	Produto do E1	10 mg L ⁻¹	NR	UPLC-Q-ToF
B	Produto do E2	10 mg L ⁻¹	NR	UPLC-Q-ToF
C	Produto do E1	500 ng L ⁻¹	SPE- off line	LC- QqQ
D	Produto do E2	500 ng L ⁻¹	SPE- on line	LC - TQD
E	Produto do E1	Água potável	SPE- off line	LC- QqQ
F	Produto do E1 e E2	Água potável	SPE- on line	LC - TQD

NR: não realizado; * E1 quando os produtos do E1 eram analisados ou E2 quando os produtos do E2 eram analisados.

4.2.2.3 Preparação das amostras - extração off line

A extração foi feita em fase sólida em cartucho SPE-C18 (LiChrolut RP-18-500 mg). O volume das amostras extraídas foi de 0,5 L, o procedimento de extração foi adaptado de Ternes et al. (1999b), com as seguintes modificações: clean-up com 9 mL de água deionizada, a eluição foi realizada com 4 mL de acetona e a ressuspensão com 0,5 mL de metanol. O padrão interno estrona- 2, 4, 16, 16 d4 foi adicionado na etapa de ressuspensão das amostras em metanol, para se obter uma concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.2.4 Preparação das amostras - Extração on-line

A extração on-line dos estrogênios foi totalmente automatizada com o equipamento de extração automática on line SPE sample processor Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, Países Baixos), conectado em série com o instrumento MS/MS da Waters (UPLC-TQD-Waters). Os cartuchos utilizados na etapa de extração foram cartuchos poliméricos: PLRP-s (10x2 mm, 15–25 μm tamanho da partícula). Os cartuchos foram previamente condicionados com 4 mL de acetonitrila e 4 mL de água (fluxo de 5 mL min^{-1}), posteriormente as amostras (250 mL) foram passadas pelo cartucho a um fluxo de 8 mL min^{-1} . O *clean-up* foi feito com 1 mL de água HPLC (fluxo de 5 mL min^{-1}) e a eluição dos compostos foi realizada automaticamente pela própria fase móvel passando pelo cartucho seguindo diretamente para a coluna cromatográfica. O software SparkLink (Spark Holland) foi utilizado para controlar todo o procedimento de extração.

4.2.2.5 Equipamento - UPLC-QqToF (UPLC/MS/MS)

As análises para a identificação dos subprodutos ($C_0 = 100 \mu\text{g L}^{-1}$), descritos na Tabela 16, foram realizadas no equipamento da Waters Acquity UPLC system (Waters) ligado ao detector de tempo de voo (QqToF -MS/MS). As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item 4.2.1.4, com a única diferença que se acrescentou 2 min no final da corrida cromatográfica nas condições iniciais, isto é, 10% ACN e 90% de água para um melhor reequilíbrio da coluna. Com isso o tempo total da corrida cromatográfica foi para 14 min.

As condições de detecção, ensaios MS e MS/MS foram as mesmas já descritas no item 4.2.1.4.

4.2.2.6 Equipamento - LC-QqQ- (LC/MS/MS)

As análises foram realizadas em equipamento da Waters Alliance 2695 ligado a uma QqQ (MS-MS). Os subprodutos do estrona ($C_0 = 500 \text{ ng L}^{-1}$), estrona e análise dos compostos presentes na água potável, descritos na Tabela 16, foram analisados em modo negativo, com uma fonte de eletrospray (ESI), com a energia do capilar de 2,75 kV, extrator 2 V, RF lentes, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de desolvatação 450°C e fluxo de 650 L h⁻¹. O gás nitrogênio foi utilizado tanto como gás nebulizador, como gás de desolvatação e o argônio foi utilizado como gás de colisão.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Purospher Star RP-18-Merck (125 x 2 mm, 5µm de tamanho de partícula). As condições cromatográficas foram: volume de injeção de 20 µL e fluxo da fase móvel de 0,2 mL min⁻¹. A fase móvel foi A (ACN) e B (água). O gradiente utilizado para a separação cromatográfica dos compostos está descrito na Tabela 17.

Tabela 17 - Gradiente da fase móvel utilizado durante a corrida cromatográfica

Tempo (min)	% A(ACN)	%B (água)
0	10	90
1	10	90
11	50	50
21	80	20
22	100	0
26	100	0
28	10	90
40	10	90

4.2.2.7 Equipamento - UPLC-TQD (UPLC/MS/MS)

O equipamento da Waters Acquity UPLC system (Waters) ligado ao – triple quadrupolo (TQD) (MS/MS) foi utilizado para as análises dos subprodutos do 17β-estradiol e dos subprodutos do estrona presentes na água potável, descritos na Tabela 16, onde foi realizada a extração on-line, não se utilizando a parte referente ao UPLC. As condições cromatográficas foram as mesmas que as usadas no item 4.2.2.6, com a diferença de não se ter volume de injeção, devido ao sistema de extração ter sido on-line. As condições de detecção do espectrômetro de massas também foram as mesmas descritas no item 4.2.2.6.

4.2.2.8 Amostras de água potável

As coletas de água potável foram realizadas na torneira das casas selecionadas, com o intuito de analisar a presença de 17β -estradiol, estrona e seus subprodutos. As coletas foram realizadas em frasco âmbar, sempre no período das 8 às 10 h da manhã. Como as coletas eram realizadas pelos moradores das residências, as amostras foram recebidas durante o período de uma semana, pois dependia da disponibilidade das pessoas para levarem as mesmas. Como a extração realizada nesta etapa foi a off-line, estas amostras foram extraídas imediatamente após sua chegada no laboratório, sem a adição de qualquer produto para a eliminação do cloro. O cloro era medido na chegada da amostra no laboratório.

A primeira coleta foi realizada no período de março, abril e maio de 2010, englobando o composto estrona e alguns de seus subprodutos (pois o método para o 17β -estradiol e seus subprodutos ainda não tinha sido desenvolvido). A Tabela 18 mostra a data, numeração das amostras e seus respectivos pontos de coleta. A extração e procedimento estão descritos no item 4.2.2.2 como tratamento E.

O cálculo do LD e LQ foi realizado automaticamente pelo programa TargetLyn assim como a curva de calibração. O cálculo se baseia na medida do sinal do ruído, isto é, a diferença entre o maior e o menor sinal cromatográfico dentro da faixa selecionada. Está medida do ruído é multiplicada por três, para se obter o valor para calcular o LD e por oito para se obter o valor para calcular o LQ. O valor obtido é então recalculado com base na curva de calibração obtendo assim o LD e o LQ. Para este grupo de amostra a recuperação foi calculada pela adição de 500 ng L^{-1} de estrona à água deionizada. Este procedimento foi realizado 4 vezes e a amostra foi analisada conforme descrito para o tratamento E (Tabela 16). Outras amostras foram analisadas com intuito de se verificar o método: amostras em branco (somente água deionizada) e amostras nas concentrações de 2 ng L^{-1} e 5 ng L^{-1} , as quais foram extraídas e analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.2.6. Além destas amostras, outras contendo os subprodutos da oxidação do estrona foram analisadas para se verificar o método dos subprodutos e confirmar os tempos de retenção dos mesmos em cada sequência cromatográfica, além de controles de qualidades (CQs).

Tabela 18 - Data e localização dos pontos de coleta da primeira amostragem de água

Data	Nº da Amostra	Endereço
4/5/2010	1	Rua: Castellbell i el Vilar, Montserrat
4/5/2010	2	Rua: 08917 - Badalona
4/5/2010	3	Rua: l'Estadella - 08030 Barcelona
4/5/2010	4	Rua: Jordi Girona- Barcelona
4/5/2010	5	Rua: la Corunya, Barcelona
4/5/2010	6	Rua: Calábria, Barcelona
7/5/2010	7	Rua: Europa, Barcelona
7/5/2010	8	Rua: Vistalegre, Santa Coloma de Gramanet
7/5/2010	9	Rua: de la Pau, Corbera de Llobregat
7/5/2010	10	Rua: Pedró de la Creo, Barcelona
7/5/2010	11	Passeio: Reina Elisenda de Montcada, Barcelona
7/5/2010	12	Passeio: Maragall, Barcelona
20/4/2010	13	Rua: Gayarre, Barcelona
19/3/2010	5	Rua: la Corunya, Barcelona
20/4/2010	4	Rua: Jordi Girona- Barcelona
29/3/2010	2	Rua: 08917 - Badalona
19/3/2010	6	Rua: Calábria, Barcelona
17/3/2010	4	Rua: Jordi Girona- Barcelona

A segunda coleta foi realizada de 1 a 9 de agosto de 2010 (Tabela 19) e englobou um maior número de compostos. A extração, compostos analisados e procedimentos estão descritos no Item 4.2.2.2 como tratamento F. Nesta coleta, o tipo de extração foi diferente, on-line, portanto, para estas amostras o cloro foi medido imediatamente após a chegada das mesmas no laboratório, sendo adicionado tiosulfato de sódio para eliminar o residual de cloro. Depois de realizado este procedimento a amostra foi congelada até a sua análise.

Tabela 19 - Localização dos pontos de coleta da segunda amostragem de água potável

nº da Amostra	Endereço
14	Rua: Jordi Girona- Barcelona
15	Barcelona
16	Rua: Pedró de la Creo, Barcelona
17	Rua: Calábria, Barcelona
18	Rua: Mas de Les Fonts, Barcelona
19	Rua: Vallirana, Baix Llobregat

Para o uso do TQD, todos os compostos tiveram que ser novamente otimizados. A mudança de equipamento em relação à primeira coleta foi devido a se obter um menor limite de detecção e a opção de se realizar a extração on-line, foi por levar a um menor erro e a um menor limite de detecção, pois todo o analito presente no cartucho entra diretamente na coluna. Tentou-se avaliar alguns parâmetros de validação, tais como: LD, LQ e linearidade, parâmetros estes que foram analisados pelo programa TargetLyn. Também se analisou amostras em branco, amostras extraídas dos subprodutos (avaliar tempo de retenção e

recuperação) e recuperação do estrona e 17 β -estradiol. A recuperação do 17 β -estradiol e do estrona foi realizada utilizando 3 amostras extraídas comparadas com 3 amostras não extraídas. A tentativa de recuperação dos subprodutos foi realizada com duas amostras extraídas e duas não extraídas.

4.2.3 Descrição do desenvolvimento dos métodos

Todos os dados foram analisados usando o MassLynx V 4.1 e targetlynx seguindo as diretrizes da directiva 2002/657/EC (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002).

Um método qualitativo foi desenvolvido para identificar os subprodutos que foram encontrados e um método quantitativo foi utilizado para quantificar estrona e 17 β -estradiol nas amostras. Duas transições foram monitoradas por composto através de selected reaction monitoring (SRM), com exceção do subproduto com m/z 303 [M-H]⁻ e 339 [M-H]⁻ nos experimentos C e D (Tabela 15). A primeira transição foi utilizada para quantificar o composto de interesse e a segunda para confirmar o mesmo.

A otimização dos dados foi realizada com as amostras dos experimentos com concentração inicial alta de hormônio como descrito a seguir:

- os subprodutos do ozônio (estrona e 17 β -estradiol) foram otimizados com as amostras extraídas (extratos) dos experimentos com concentração inicial de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- os subprodutos do cloro foram otimizados com amostras extraídas do ensaio de 10 mg L^{-1} (estrona e 17 β -estradiol).
- para os subprodutos do estrona com cloro uma das amostras após 24 h de tempo de contato foi liofilizada (1 L) e o pó resultante foi utilizado como padrão na parte de otimização.

A otimização das condições a serem utilizadas para a identificação dos compostos por MS/MS em geral consistiam nos seguintes passos:

- otimização da energia do cono (modo scan)
- verificação e escolha de 3 fragmentos formados (daughter scan)
- otimização da energia de colisão dos fragmentos selecionados (daughter scan)
- escolha em modo SRM dos 2 fragmentos a serem utilizados, inclusive selecionando a primeira e a segunda transição.
- escolha da divisão de janelas caso um número elevado de compostos esteja sendo analisada (SRM).
- confirmação da temperatura da fonte e temperatura de desolvatação.
- teste final com todos os analitos para verificação de possíveis problemas.

4.3 Apresentação e análise dos dados

Durante a discussão dos dados apresentada nesta tese, optou-se por adotar a apresentação dos gráficos conectando os pontos. Esta decisão teve intenção de oferecer uma melhor visualização dos dados e da tendência das diferentes variáveis apresentadas. No entanto, há tratamentos que foram realizados utilizando dados discretos, isto é, cada tratamento foi realizado individualmente, como por exemplo: dose de cloro 1 mg L^{-1} e 30 min e outro tratamento foi realizado para a dose de cloro 1 mg L^{-1} e 10 min. E há tratamentos os quais os dados foram coletados continuamente, isto é, ao longo do tempo, como exemplo: dose de cloro 2 mg L^{-1} coletados com 1 h, 4 h e 8 h. Para que fique claro ao leitor de qual conjunto de dados estamos discutindo, ao final de cada gráfico será explicado como os dados foram coletados, como segue:

- * Dados discretos

- * Dados contínuos

4.4 Resumo do Material e Métodos

Os ensaios, os principais equipamentos e métodos utilizados estão resumidos na Figura 19, assim como o local onde o ensaio e análises foram realizados. Esta explicação se faz necessária devido ao elevado número de técnicas e combinações das mesmas e também a se ter realizado ensaios no Brasil e na Espanha.

Figura 19 - Fluxograma dos ensaios, análises e equipamentos realizados durante o doutorado (Brasil) e o doutorado sanduíche (Espanha)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento da metodologia para a identificação dos hormônios

Primeiramente fez-se a varredura em um espectrofotômetro de fluorescência - modelo F 4500 da Hitachi - com intuito de verificar as melhores condições para a excitação e emissão do 17β -estradiol e do estrona. De acordo com Raimundo (2007) e Sodré et al. (2007), as condições para a identificação do 17β -estradiol seriam emissão em 230 e excitação em 310 nm. Entretanto, Araújo (2006) selecionou a excitação em 280 nm e emissão em 306 nm. Souza (2008) selecionou os comprimentos de onda de 230 nm para excitação e 306 nm para emissão tanto para o estrona como para o 17β -estradiol. Baseado na literatura realizou-se a varredura mantendo a emissão em 306 nm para o 17β -estradiol e variou-se a excitação (Figura 20).

Dois comprimentos de onda de excitação foram selecionados, 230 e 280 nm, para os quais se obteve maior intensidade de fluorescência. Para os dois comprimentos de onda de excitação selecionados obteve-se o espectro de emissão variando-se o comprimento de onda de 280 a 540 nm. Comprovou-se que a maior emissão ocorreu em comprimento de onda de 306 nm (Figura 21). Portanto, os comprimentos de onda de excitação e emissão com melhores respostas foram 280 nm excitação e 306 nm emissão para o 17β -estradiol.

Figura 20 - Espectro de excitação com $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol, emissão em 306 nm e varredura de 200 a 300 nm

Figura 21 - Espectro de emissão com $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol, excitação em 230 e 280 nm e varredura de emissão de 280 a 540 nm

Para o estrona seguiu-se o mesmo procedimento, fixando a emissão em 306 nm. De acordo com os dados presentes na Figura 22, o melhor comprimento de onda de excitação foi 280 nm. No entanto foram selecionados os comprimentos de onda de 280 e 230 nm devido aos testes que serão apresentados mais adiante. A excitação foi feita nos comprimentos de onda de 280 e 230 nm e em ambos a intensidade de resposta foi semelhante, com o sinal mais definido em 280 nm do que 230 nm. Como o pico para emissão não ficou bem definido selecionaram-se os dois comprimentos de onda 306 e 310 nm (Figura 23).

Figura 22 - Espectro de excitação com $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de estrona, emissão em 306 nm e varredura de excitação de 200 a 300 nm

Figura 23 - Espectro de emissão com $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de estrona, excitação em 230 e 280 nm com varredura de emissão de 280 a 440 nm

Seguiu-se para o desenvolvimento da metodologia com uso de CLAE. Inicialmente foram realizados testes com uma coluna Zorbax SB-C18, porém verificou-se que esta possuía baixa reprodutibilidade. Testou-se então a coluna C18-PAH a qual apresentou melhores resultados em relação à precisão.

Para confirmar as condições previamente selecionadas para o 17β -estradiol testou-se a excitação em 230 e 280 nm no CLAE-FLU mantendo-se a emissão em 306 nm. Os dois cromatogramas obtidos estão representados na Figura 24. Pode-se observar que o ruído está maior e o sinal analítico do composto menor em 280 nm em relação ao comprimento de onda de 230 nm, portanto as melhores condições foram 230 nm para a excitação e a emissão em 306 nm para o 17β -estradiol.

Na Figura 25 está representado o cromatograma do estrona com emissão e excitação em 230 e 280 nm. Verifica-se que a excitação em 230 nm possui resposta melhor do que em 280 nm. Na Figura 26 pode-se verificar que a emissão em 310 nm é melhor do que em 306 nm. Portanto, as melhores condições para o estrona foram a excitação em 230 nm e emissão 310 nm.

Figura 24 - Cromatograma de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol fixando a emissão em 306 nm

Figura 25 - Cromatograma de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do estrona fixando a emissão em 306 nm

Figura 26 - Cromatograma de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do estrona fixando a excitação em 230 nm

Para a definição da metodologia de extração a ser utilizada foram testadas duas metodologias de extração como descrito na Figura 27.

Como pode ser verificado na Figura 28 constata-se que o método de extração de Ternes et al. (1999b) é o que possui melhor resposta analítica se comparado com a metodologia de Araújo (2006) para o composto 17β -estradiol. Considerou-se que por serem compostos com estrutura semelhante à eficiência de extração seria aproximadamente a mesma, portanto utilizou-se o mesmo método de extração para o estrona.

Figura 27 - Fluxograma com a descrição das diferentes metodologias de extração testadas

Figura 28 - Cromatograma comparando os extratos obtidos por diferentes métodos de extração do 17 β -estradiol

Definidas as condições de operação do detector de fluorescência e extração foram realizados alguns testes para verificar qual era o limite de detecção do cromatógrafo para o 17 β -estradiol e o estrona e se havia a necessidade de realizar a extração da amostra. Esta avaliação decorreu do fato de que a matriz de estudo é uma matriz limpa e aliado a isto, sempre antes de cada tratamento com cloro ela era filtrada em membrana de 0,45 μ m. Verificou-se que para o 17 β -estradiol o cromatógrafo detectava até 1 μ g L⁻¹ sem extração e para o estrona, na faixa de trabalho escolhida e nas condições selecionadas, a metodologia deveria englobar a etapa de extração. Portanto, seriam três condições a serem validadas: a estrona com extração e o 17 β -estradiol com e sem a etapa de extração. No caso do 17 β -estradiol a etapa de extração foi adicionada para aumentar o limite de detecção.

5.2 Validação de métodos para determinação de estrona e 17 β -estradiol

Para iniciar a validação escolheu-se que a matriz de estudo seria a água do poço artesiano situado no Campus da USP - São Carlos, Área 1. A escolha desta matriz baseou-se no fato de se obter água com as características o mais próximo possível de uma água após a etapa de filtração em ETA. A Portaria MS 518 (BRASIL, 2004) regulamenta que a água após a unidade de filtração com tratamento de ciclo completo deve ter no máximo 1,0 uT e 15 uH.

A água do poço utilizado possui, em média, $0,42 \pm 0,18$ uT e cor muito baixa, na maioria das vezes não detectada. Portanto é uma água que atende aos padrões da Portaria MS 518, sendo uma água de fácil acesso para o estudo e que pode ser coletada antes da cloração.

5.2.1 Validação do método para a determinação do 17 β -estradiol considerando a etapa de extração

Ao fazer a seletividade e confirmar o uso da matriz escolhida houve a necessidade de verificar se havia 17 β -estradiol na água do poço do compus da USP- São Carlos, Área 1. Realizou-se a extração de acordo com a metodologia com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol em água Milli-Q e a extração apenas da matriz de interesse supostamente sem hormônio na proporção da fase móvel de 50:50 ACN:H₂O. Como pode ser verificado na Figura 29 há um pico no tempo de retenção do analito. Duas hipóteses foram avaliadas: há 17 β -estradiol na matriz de estudo ou existe um interferente no tempo de retenção do mesmo. Portanto, variou-se a proporção da fase móvel de ACN:H₂O para verificar a presença do 17 β -estradiol na matriz.

Como pode ser observado nos gráficos das figuras 30 e 31 em algumas proporções da fase móvel houve interferentes no tempo de retenção do 17 β -estradiol e em outras proporções a co-eluição de picos (ombro). A proporção da fase móvel que foi satisfatória foi a de 48:52 com a qual se conseguiu deslocar o interferente do tempo de retenção do 17 β -estradiol e não ocorreu nenhuma co-eluição. Portanto, infere-se que não há 17 β -estradiol na matriz de interesse. No entanto, a comprovação só pode ser feita por técnicas mais apuradas como, por exemplo, com uso de espectrômetro de massas.

Figura 29 - Cromatograma com a fase móvel na proporção de 50:50 co-eluição de um composto no tempo de retenção do 17 β -estradiol

Figura 30 - Cromatograma da fase móvel na proporção de 58:42 ACN:H₂O - interferente no tempo de retenção do 17 β -estradiol

Figura 31 - 17 β -Estradiol com concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diferentes proporções da fase móvel

O método mostrou-se seletivo para o 17 β -estradiol como mostra o cromatograma da Figura 32, que representa os resultados da comparação, após passar por toda a metodologia, da água do poço utilizado com a água deionizada dopada com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol.

O limite de detecção (LD) foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito de interesse, até o menor nível detectável, resultando um valor de 40 ng L^{-1} com área de $3,8 \pm 0,1$. Este valor é obtido através da análise em triplicata de uma amostra fortificada submetida à metodologia, a qual resulta em um pico cromatográfico significativo apresentando a respectiva altura em torno de quatro vezes a amplitude do ruído. Considerou-se como ruído, para todas as validações, a resposta cromatográfica que estivesse dentro de ± 1 minuto do tempo de retenção do analito.

Figura 32 - Seletividade do 17 β -estradiol na proporção da fase móvel de 48:52 ACN:H₂O

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi calculado de maneira similar, levando-se em consideração um pico cromatográfico significativo apresentando a respectiva altura em torno de cinco vezes a amplitude do ruído, fato que resultou em valor de 50 ng L⁻¹, avaliando-se e confirmando-se que neste nível tal valor é obtido com precisão e exatidão aceitáveis.

Os dados obtidos para a aceitação da curva de calibração atendeu todos os requisitos estabelecidos pela ANVISA, como apresentado na Tabela 20. A exatidão está dentro do limite de variação esperado em todos os pontos da curva, chegando ao máximo de 118% para o LIQ. A precisão, em todos os pontos da curva de calibração, não ficou acima de 6%. O coeficiente de correlação linear (R) foi de 0,9993, sendo muito acima do que é exigido pela ANVISA, que é de 0,98. Este valor é obtido a partir dos dados na Figura 33, na qual foi traçada a curva de calibração e calculado o coeficiente de determinação (R²) para a determinação da linearidade do método (uso do método de mínimos quadrados).

Tabela 20 - Dados utilizados na construção da curva analítica com a precisão e exatidão dos pontos analisados

Amostras (ng L ⁻¹)	Área média	Concentração (ng L ⁻¹)				Precisão (CV%)	Exatidão (%)
		rep 1	rep 2	rep 3	Média		
50	4,5	58,4	59,1	58,9	58,8	0,6	117,6
250	17,0	259,3	248,4	232,7	246,8	5,4	98,7
450	30,2	438,9	457,3	437,4	444,5	2,5	98,8
650	42,7	638,1	643,8	615,8	632,5	2,3	97,3
850	58,7	856,8	880,0	880,4	872,4	1,6	102,6
1000	66,9	978,4	1000,2	1008,5	995,7	1,6	99,6

rep = repetição

Figura 33 - Curva analítica do 17 β -estradiol contemplando a faixa linear de 50 ng L⁻¹ até 1000 ng L⁻¹, com extração

A precisão foi realizada nas concentrações de 50 ng L⁻¹ (baixa), 400 ng L⁻¹ (média) e 750 ng L⁻¹ (alta) (Tabela 21). A metodologia é precisa e exata tanto para as amostras feitas no mesmo dia (repetibilidade) como para amostras feitas em dias diferentes (precisão e exatidão intermediárias). A repetibilidade foi menor para o LIQ, fato já esperado por se tratar de uma concentração a níveis muito baixos o que resulta em grandes desvios, pois qualquer variação na metodologia leva à grande desvio na leitura da amostra. Este fato foi analisado e documentado por Horwitz et al. (1980). No entanto, tal variabilidade ainda está dentro da faixa permitida para o LIQ (máximo de 20% de variação com relação à precisão). A precisão intermediária aumentou para o LIQ e diminuiu para as concentrações média e alta, mas ainda está dentro do limite de variação que é de 15%. Esta variação é explicável, pois todas as condições que potencialmente interferem na metodologia (por exemplo, aparelho, umidade, temperatura ambiente e vidraria) foram diferentes no ensaio intermediário o qual foi realizado uma semana após a repetibilidade, demonstrando que a metodologia, mesmo em condições distintas, é suficientemente robusta com relação aos parâmetros de precisão e exatidão.

Para o LIQ a exatidão foi menor tanto para a repetibilidade como para a exatidão intermediária se comparado com as concentrações média e alta, para as quais a mesma variou entre 101 a 107%. A exatidão diminuiu para todos os níveis de concentração considerando a exatidão intra-corrida. Contudo, a metodologia mostrou-se exata atendendo as variações permitidas na RE-899 (ANVISA, 2003), com uma variação maior na pior situação, que foi para o nível LIQ, resultando em 116%.

Tabela 21 - Precisão (CV) e exatidão inter e intra- corrida da metodologia considerando a etapa de extração para o 17 β -estradiol

Amostras (ng L ⁻¹)	Intra-corrida (n = 5)			Inter-corrida (n = 10)		
	média (ng L ⁻¹)	Precisão%	Exatidão %	média (ng L ⁻¹)	Precisão %	Exatidão %
50	55,6	10,2	111,2	57,8	9,0	115,7
400	402,8	0,4	100,7	422,3	9,2	105,6
750	765,5	1,5	102,1	798,5	4,9	106,5

n = número de amostras

A recuperação nestas condições teve uma variação de 119 a 88% mostrando que a metodologia é adequada para a extração, quantificação e detecção do 17 β -estradiol em concentrações em nível de traço (Tabela 22).

Tabela 22 - Porcentagem de recuperação da metodologia considerando a etapa de extração do 17 β -estradiol

Amostra (ng L ⁻¹)	Recuperação %			Média
	rep 1	rep 2	rep 3	
50	125	106	126	119
400	97	91	84	91
750	90	88	85	88

rep = repetição

Os dados expostos neste trabalho estão de acordo com o encontrado por Alda e Barceló (2000), que com uso do DAD acoplado a um detector de massas encontraram LD de 50 ng L⁻¹, com recuperação de 96,9% e precisão de 10,9% para o 17 β -estradiol. Em outro estudo, no entanto utilizando LC-ESI-MS, o LD encontrado foi de 2,5 ng L⁻¹, com recuperação de 98% e precisão de 10% (RODRIGUES-MOZAZ et al., 2004).

5.2.2 Validação do método para determinação do 17 β -estradiol sem a etapa de extração

Foi verificado que o limite de detecção do aparelho para o 17 β -estradiol sem extração era até 1 μ g L⁻¹ com a matriz de estudo. Portanto, para a economia de cartuchos e de tempo decidiu-se validar um método que contemplasse a concentração de 1 a 300 μ g L⁻¹ de 17 β -estradiol. A metodologia consistiu em filtração da amostra em membrana de 0,45 μ m e leitura direta no HPLC-FLU.

A metodologia mostrou-se seletiva para a matriz na proporção da fase móvel de 60:40 de ACN:H₂O (Figura 34).

Figura 34 - Seletividade do 17 β -estradiol com a fase móvel de 60:40 ACN:H₂O

O LD foi de 900 ng L⁻¹ (Figura 35), com uma área de 0,2486, e o LQ foi de 1000 ng L⁻¹. Doparam-se várias amostras para encontrar a faixa linear de trabalho. Não foi possível aplicar somente uma curva analítica na faixa de trabalho de interesse, que era de 1 a 300 µg L⁻¹, pois a exatidão nas concentrações mais baixas encontrava-se alta. Com isso, duas curvas foram feitas e validadas, uma de 1 a 25 µg L⁻¹ e outra de 25 a 360 µg L⁻¹. O limite superior de 360 µg L⁻¹ foi escolhido porque a ANVISA (2003) determina que a curva analítica seja feita como limite superior até 120% da concentração que se pretende analisar. A concentração que se propôs utilizar na pesquisa inicialmente era de 300 µg L⁻¹, conseqüentemente a maior concentração da curva foi de 360 µg L⁻¹.

Figura 35 - Cromatograma mostrando o pico referente ao LD da metodologia para detecção do 17 β -estradiol

A linearidade de 1 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentou-se exata e precisa, com a maior variação para o LQ de 81% o que está dentro do permitido pela ANVISA (20%). Para os outros pontos da curva a exatidão esteve próxima a 100% e a precisão esteve abaixo de 2% o que mostra ótima repetibilidade das amostras mesmo em baixas concentrações (Tabela 23). O coeficiente de correlação linear (R) foi de 0,9999 (Figura 36).

Tabela 23 - Dados da curva analítica com a precisão (CV) e exatidão

Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área Média	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Precisão (CV%)	Exatidão (%)
		rep 1	rep 2	rep 3	Média		
1	0,26	0,9	0,8	0,8	0,8	1,6	81,0
4	0,95	4,1	4,1	4,1	4,1	0,2	102,5
8	1,81	8,2	8,2	8,1	8,2	0,2	102,2
14	3,04	13,7	14,3	14,0	14,0	0,4	100,0
17	3,66	16,8	17,0	17,0	16,9	0,1	99,6
25	5,36	25,2	24,9	24,9	25,0	0,1	99,9

rep = repetição

Figura 36 - Variação da concentração do 17β-estradiol para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de 1 µg L⁻¹ a 25 µg L⁻¹, sem extração

A precisão e exatidão intra e inter-corridas estavam dentro dos valores pré-estabelecidos pela ANVISA com máximo de 12% de variação na precisão inter-corridas e com a menor exatidão para a intra-corrida com 81% para o limite de quantificação (Tabela 24).

Tabela 24 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa

Amostras (µg L ⁻¹)	Intra-corridas (n=5)			Inter-corridas (n=10)		
	Média (µg L ⁻¹)	Precisão %	Exatidão %	Média (µg L ⁻¹)	precisão %	Exatidão %
1	0,8	8	81	0,8	8	84
10	9,2	3	92	10,9	12	109
20	20,1	5	101	19,5	5	98

n = número de amostras

Esperava-se que a recuperação fosse mais alta, por não se usar metodologia extensa até a injeção das amostras. No entanto, a recuperação variou $\pm 10\%$ do valor real o que pode ser explicado por se obter concentração muito baixa, da ordem de microgramas por litro, podendo estar susceptível a interferência do ruído (Tabela 25).

Tabela 25 - Porcentagem de recuperação do método para as concentrações baixa, média e alta

Amostra (µg L ⁻¹)	Recuperação %			Média (µg L ⁻¹)
	rep 1	rep 2	rep 3	
1	119,5	94,8	112,8	109,0
10	93,1	89,5	94,4	92,3
20	99,0	93,7	102,2	98,3

rep = repetição

Para a concentração de 25 a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$, a menor concentração da curva de calibração foi a que apresentou a menor exatidão com 114%. A precisão foi excelente, sendo menor que 1% para todos os pontos analisados. Este fato pode ser explicado por não se ter usado, nesta validação, uma metodologia extensa e concentrações mais elevadas o que aumentou a precisão do método (Tabela 26). O coeficiente de correlação foi de 0,9997 sendo que a ANVISA (2003) recomenda que seja maior do que 0,98 (Figura 37).

Tabela 26 - Dados da curva analítica com a precisão (CV) e exatidão

Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área Média	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Precisão (%)	Exatidão (%)
		rep 1	rep 2	rep 3	Média		
25	5,4	28,6	28,4	28,4	28,5	0,1	113,8
70	14,1	69,2	68,3	67,4	68,3	0,3	97,6
140	28,9	134,9	134,5	138,6	136,0	0,4	97,1
210	45,1	205,2	212,9	211,6	209,9	0,4	100,0
280	61,1	280,9	285,0	282,3	282,7	0,2	101,0
360	77,9	343,4	372,2	363,0	359,5	0,9	99,9

rep = repetição

Figura 37 - Variação da concentração do 17 β -estradiol para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$, sem extração

Para a precisão intra e inter-corridas houve uma variação de no máximo 5% e para a exatidão esta foi maior para o menor ponto da curva com 108% (Tabela 27). Portanto, a metodologia foi precisa e exata de acordo com a ANVISA (2003).

Tabela 27 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa

Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intra-corridas (n=5)			Inter-corridas (n=10)		
	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão %	Exatidão %	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	precisão %	Exatidão %
25	26,9	5	108	26,0	5	104
170	180,8	3	106	180,7	1	106
316	328,7	2	104	333,0	1	105

n = número de amostras

A recuperação aumentou de acordo com o aumento da concentração chegando a 100% na concentração alta. A recuperação foi satisfatória e está dentro do permitido pela ANVISA (2003) (Tabela 28).

Tabela 28 - Porcentagem de recuperação da metodologia sem a etapa de extração nas concentrações baixa, média e alta

Amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação %			Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	rep 1	rep 2	rep 3	
25	87,9	88,0	88,4	88,1
170	98,3	99,8	99,5	99,2
316	104,0	96,9	100,6	100,5

rep = repetição

5.2.3 Validação da método para a determinação do estrona considerando a etapa de extração

O cromatograma da Figura 38 demonstra que a metodologia é seletiva para o estrona uma vez que no tempo de retenção do analito ($T_r = 6,4$ min) não existem sinais significativos que correspondam à presença de interferentes para a água de estudo selecionada.

Figura 38 - Seletividade do estrona com concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$

O LD foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ com um pico cromatográfico significativo apresentando a respectiva altura em torno de 3 vezes a amplitude do ruído e o LQ de $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Devido ao fato de a precisão e exatidão não atenderem aos requisitos exigidos para a linearidade em uma mesma curva que contemple a concentração de $1,5$ a $360 \mu\text{g L}^{-1}$, houve a necessidade da construção de duas curvas. Uma estabelecida entre as concentrações de $1,5$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 39) e outra entre 10 a $360 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 40).

Figura 39 - Variação da concentração do estrona para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$

Figura 40 - Variação da concentração do estrona para a construção da curva analítica contemplando a faixa linear de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ a $360 \mu\text{g L}^{-1}$

Para as duas curvas de calibração – 1,5 a 10 e 10 a $360 \mu\text{g L}^{-1}$ – o coeficiente de correlação (R) foi satisfatório, de 0,9967 e 0,9998, respectivamente. Nas Tabelas 29 e 30 pode-se observar que todos os pontos da curva atenderam ao requisito de exatidão, apresentando variação na precisão de no máximo 7,4%.

Tabela 29 - Dados da curva analítica contemplando a concentração do estrona de 1,5 a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ com a precisão (CV) e exatidão dos pontos de calibração

Amostra $\mu\text{g L}^{-1}$	Área média	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$				Precisão %	Exatidão %
		rep 1	rep 2	rep 3	Média		
1,5	1,5	1,7	1,5	1,7	1,6	7	109
3,5	5,3	3,3	3,4	3,3	3,3	2	95
5	9,3	5,0	5,2	5,2	5,1	3	103
6,5	12,6	7,0	6,1	6,4	6,6	7	101
8	14,7	7,7	7,6	7,5	7,6	1	94
10	20,8	9,9	10,1	10,9	10,3	5	103

rep = repetição

Tabela 30 - Dados da curva analítica contemplando a concentração do estrona de 10 a $360 \mu\text{g L}^{-1}$ com a precisão (CV) e exatidão dos pontos da curva de calibração

Amostra $\mu\text{g L}^{-1}$	Área média	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$				Precisão %	Exatidão %
		rep 1	rep 2	rep 3	Média		
10	21,3	11,4	11,5	11,5	11,5	0,2	115
70	166,2	67,6	67,4	67,5	67,5	0,1	96
140	353,0	138,7	144,9	135,7	139,8	3,3	100
210	534,8	211,3	216,3	202,7	210,1	3,3	100
280	723,6	278,1	287,9	283,3	283,1	1,8	101
360	917,5	361,1	361,3	351,9	358,1	1,5	99

rep = repetição

Nas Tabelas 31 e 32 verifica-se que a precisão, que representa a repetibilidade das

amostras variou no máximo em 9%, tanto para amostras inter ou intra-corridas. A exatidão, que representa o grau de concordância entre os resultados encontrados e o valor aceito como referência, variou de 91 a 115%, sendo que não houve grandes diferenças entre a exatidão inter-corrida para a exatidão intra-corrida.

Tabela 31 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa da curva de calibração de 1,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$

Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intra-corridas (n=5)			Inter-corridas (n=10)		
	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão %	Exatidão %	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão %	Exatidão %
1,5	1,7	5	114	1,7	9	114
5	4,9	7	97	4,8	9	96
9	8,3	9	93	8,3	7	92

n = número de amostras

Tabela 32 - Precisão (CV) e exatidão intra e inter-corrida da metodologia nas concentrações alta, média e baixa da curva de calibração de 10 a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$

Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intra-corridas (n=5)			Inter-corridas (n=10)		
	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão %	Exatidão %	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	precisão %	Exatidão %
10	11	1,6	115	11	4	113
160	156	8,9	98	154	7	96
320	292	2,5	91	306	5	95

n = número de amostras

De acordo com o exposto nas Tabelas 33 e 34, a recuperação do estrona na faixa linear de 10 a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$ está baixa na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, com 77% de recuperação e nas concentrações média (160 $\mu\text{g L}^{-1}$) e alta (250 $\mu\text{g L}^{-1}$) as recuperações do estrona estão próximas a 100%. Contudo, observa-se que as recuperações do estrona na curva de 1,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ se mantêm em torno de 75% na concentração média (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) e alta (9 $\mu\text{g L}^{-1}$) e para a concentração baixa (1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) a recuperação do composto diminui pra 57%. Esta recuperação está abaixo da idealidade, no entanto pode ser considerada adequada para a validação, pois apresenta precisão e exatidão dentro dos limites preconizados pela norma (ANVISA, 2003). Entretanto, ressalvas devem ser feitas quando concentrações desta ordem de grandeza forem encontradas em amostras ambientais, pois a concentração estaria subestimada, devendo-se fazer a confirmação da mesma por outras técnicas mais apuradas.

Tabela 33 - Porcentagem de recuperação da metodologia nas concentrações baixa, média e alta considerando a curva de calibração de 1,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$

Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação %			Média %
	rep 1	rep 2	rep 3	
1,5	44	71	55	57
5	79	65	87	77
9	74	75	77	75

rep = repetição

Tabela 34 - Porcentagem de recuperação da metodologia nas concentrações baixa, média e alta considerando a curva de calibração 10 a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$

Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação %			Média %
	rep 1	rep 2	rep 3	
10	73	82	76	77
160	95	92	93	93
250	93	100	98	97

rep = repetição

Para o estrona as concentrações encontradas estão aquém dos resultados obtidos por outros autores. Alda e Barceló (2000) com uso de DAD acoplado a detector de massas encontraram LD de 50 ng L^{-1} , recuperação de 97,7% e precisão de 11,7% para o estrona.

5.3 Ensaio de oxidação com cloro

Foram feitos testes preliminares a fim de verificar se a presença de *E.coli* em concentração elevada iria alterar a concentração do hormônio na água. O teste foi realizado com 17 β -estradiol na concentração de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, cloro com 1 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, 9×10^3 unidade formadora de colônia (UFC) de *E.coli*/100 mL e tempo de contato de 30 minutos. Os resultados estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 - Tratamentos preliminares com 1 mg L^{-1} de cloro e tempo de contato de 30 min

Tratamento	Residual de cloro total	<i>E.coli</i>	Hormônio
	(mg L^{-1})	(UFC/100 mL)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Hormônio			329
Cloro	0,81		
Cloro + <i>E.coli</i>	0,58	0	
Cloro + hormônio	0,35		11
Hormônio + <i>E.coli</i> + cloro	0,26	0	12
Hormônio+ <i>E.coli</i>		5×10^3	339

A demanda de cloro aumentou na seguinte sequência: somente cloro < *E.coli* + cloro <

Hormônio+cloro < *E.coli* + hormônio + cloro. Apesar de se ter aumento da demanda de cloro na presença simultânea de *E.coli* + hormônio + cloro, está não foi exatamente igual à soma das demandas individuais. O que pode ter ocorrido é uma maior afinidade da reação do cloro com a *E.coli* ou com o 17 β -estradiol. No entanto, este fato não se confirma, pois não houve diminuição da eficiência de remoção do hormônio na presença de *E.coli* (12 $\mu\text{g L}^{-1}$) e na ausência de *E.coli* (11 $\mu\text{g L}^{-1}$) além do fato de a *E.coli* ter sido inativada eficientemente na presença do hormônio.

Não foi observada nenhuma inativação de *E.coli* no tratamento na ausência de cloro. A presença somente do hormônio também não levou a nenhuma alteração na concentração de *E.coli* que foi de 9×10^3 para 5×10^3 UFC/100 mL. Houve inativação de 3 log de *E.coli* com CT de 30 mg min L⁻¹ de cloro. De acordo com USEPA (1999), com este valor de CT se consegue remoção de 1,0 log de cistos de *Giardia* e com CT de 6 mg min L⁻¹, 4 log de remoção de vírus é obtido.

A presença de *E.coli* na concentração de 9×10^3 UFC/100 mL não alterou a concentração de 17 β -estradiol que foi de 339 $\mu\text{g L}^{-1}$ e na sua ausência de 329 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo esta diferença possivelmente explicada pela própria variação do método de detecção do hormônio.

A remoção de 17 β -estradiol de 96,7% e 96,4% nestas condições, ou seja, concentração inicial de 17 β -estradiol 334 $\mu\text{g L}^{-1}$ (média dos dois tratamentos), cloro com 1 mg L⁻¹ e 9×10^3 UFC de *E.coli*/100 mL é pequena em se tratando de hormônios, pois seu residual de 11 $\mu\text{g L}^{-1}$ é passível de causar efeitos deletérios nos organismos.

5.3.1 Oxidação do 17 β -estradiol

Dentre os parâmetros que foram avaliados no início e ao fim dos tratamentos houve pequenas variações para a maioria dos parâmetros analisados após a cloração. Cor, pH e turbidez tiveram uma redução, houve consumo de alcalinidade e um aumento da condutividade (Tabela 36). Considerando somente os resultados das variáveis analisadas observa-se que a água apresenta características de água tratada adequada ao consumo humano.

Tabela 36 - Variáveis analisadas antes e após os ensaios com cloro

Variáveis	Antes/Cloração (n = 24)		Após/Cloração (n = 24)	
	Média	DP	Média	DP
Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	29,1	3,5	26,0	3,8
Condutividade (mS cm ⁻¹)	59,6	8,9	145,6	30,8
Cor (uH)	0,6	1,6	0,5	1,3
pH	7,1	0,2	6,7	0,1
Temperatura °C	16,0	2,8	17,0	2,8
Turbidez (uT)	0,40	0,19	0,36	0,18

DP: Desvio Padrão, n: número de amostras

Todas essas variáveis foram acompanhadas nos diferentes tratamentos, no entanto três delas apresentaram variações que merecem destaque: alcalinidade, condutividade e pH. Assim sendo, vários delineamentos foram realizados considerando esses parâmetros, alguns deles estão apresentados na Figura 41.

A condutividade aumentou com o aumento da dose aplicada de cloro Figura 41A. Entretanto, quando se avalia a mesma dose de cloro com diferentes concentrações iniciais há uma inversão no aumento da condutividade, com o maior aumento para a concentração de 1 µg L⁻¹ e 100 ng L⁻¹ em relação à 100 µg L⁻¹ (Figura 41B). No tratamento com 2 mg L⁻¹ e 100 µg L⁻¹ observa-se claramente um aumento na condutividade e depois um caimento brusco até o tempo de 10 min, indicando uma diminuição em aproximadamente 50% da quantidade íons que foram formados nos primeiros 5 min, fato este que não pode ser observado para os outros parâmetros devido a não se possuir tantos dados como para este tratamento.

Considerando a variação dos valores de pH na Figura 41D quanto menor a concentração inicial de 17β-estradiol menor foi o pH final, seguindo a mesma tendência a alcalinidade total e a alcalinidade parcial, principalmente considerando o tempo de 30 min (Figura 41F e 41H). Na concentração de 100 µg L⁻¹ em diferentes concentrações de cloro sempre há uma diminuição no valor do pH seguido de um aumento do mesmo (Figura 41C). A diminuição do pH não era um fato esperado devido a se ter usado hipoclorito de sódio, que em geral leva a um aumento no pH. Para a concentração de cloro de 2 mg L⁻¹ a diminuição do pH ocorre no primeiro minuto seguido de um aumento nos próximos 10 min. Para a concentração de 2 mg L⁻¹ verifica-se claramente que foram nos primeiros 10 min que ocorreram as maiores alterações, tendência da maioria dos parâmetros analisados. Para as outras duas concentrações de cloro, a tendência foi a mesma, diminuição do pH até os 10 min e posteriormente um aumento. O que se conclui de acordo com o exposto nos gráficos da Figura 41C e 41D é que a maior concentração inicial influenciou para evitar a queda do pH, principalmente considerando o tempo de 30 min. A redução do pH, pode ser devido ao

consumo de hidroxilas (OH) e/ou ao consumo do cloro livre.

Pode-se verificar na Figura 41C que com a concentração inicial igual de 17 β -estradiol, porém em diferentes dosagens de cloro, o pH não decresceu tanto como o ocorrido na Figura 41D, considerando principalmente as concentrações de 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹. Baseado no que será discutido e verificado adiante, quanto maior a concentração de 17 β -estradiol maior a remoção, constatou-se que o aumento de pH ocorrido entre o tempo de 1 a 10 min em 2 mg L⁻¹, poderia ter ocorrido tardiamente para as concentrações de 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹, isto é, de 10 a 30 min, devido à remoção ser menor, ou a velocidade de reação mais lenta. Como forma de suportar esta hipótese, a Figura 41G mostra uma queda na alcalinidade parcial e total para a concentração de 2 mg L⁻¹ nos tempos de 1 a 10 min, justamente quando ocorre o aumento de pH, fato este que ocorre para a concentração 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹, no entanto no tempo de 10 a 30 min, isto é, aumento de pH com queda da alcalinidade parcial e total. Outro fato que pode ser considerado é que na concentração inicial de 17 β -estradiol mais elevada houve formação de subprodutos no primeiro minuto que consumiram OH e/ou cloro, e após o primeiro minuto foram sendo lentamente degradados, pois se esta queda no pH estivesse ligada somente à degradação do 17 β -estradiol, teria sido continua (Figura 42).

Figura 41 - Variação dos parâmetros - Δ = parâmetro no final do ensaio – Parâmetro no início do ensaio na oxidação de E2 por meio do cloro * dados discretos

Figura 42 - Comparação entre a degradação de E2 com 2 mg L^{-1} e $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cloro e a variação no pH.

* dados discretos

Na verificação do cloro como desinfetante resultou que para todos os CT avaliados a remoção de *E.coli* esteve acima de 3 log. Em apenas três tratamentos com os CT de 8, 10 e 14 (Tabela 37) a presença de *E.coli* foi confirmada.

Tabela 37 - Detecção de <i>E.coli</i> em diferentes CT			
CT ($\text{mg min}^{-1} \text{ L}^{-1}$)	<i>E. coli</i> (UFC/100 ml)		
	repetição 1	repetição 2	repetição 3
8	0	10	0
10	0	0	2
14	1	0	0

A presença de coliformes totais foi mais frequente nos diferentes tratamentos. Os valores em vermelho apresentam claramente uma contaminação pontual (Tabela 38). Outra tendência observada foi que até o CT de $10 \text{ mg min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ a presença de coliformes totais ocorreu em três ou duas repetições, indicando a ineficiência na inativação desse indicador. Para CT maior que $10 \text{ mg min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ a presença de coliformes totais, quando ocorre, é somente em uma das repetições e não nas três (Tabela 38), com exceção para um dos CT = $30 \text{ mg min}^{-1} \text{ L}^{-1}$. Portanto, conclui-se que para CT menores do que $14 \text{ mg min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ a desinfecção com cloro não é eficiente na faixa de pH considerada.

Tabela 38 - Presença de coliformes totais após desinfecção com cloro

CT (mg min ⁻¹ L ⁻¹)	Coliformes totais (UFC/100 mL)		
	repetição 1	repetição 2	repetição 3
2	1	0	0
5	1	1	1
5	1	1	0
8	10	10	1
10	2	2	0
10	0	0	0
14	1	0	0
20	1	0	0
20	0	0	100
30	2	1	120
30	0	0	0
40	1	0	0
60	4	0	0
60	1	0	0
150	0	0	0

Nos primeiros ensaios procedeu-se análise estatística para avaliar se havia diferença significativa na remoção do 17 β -estradiol entre a dose de cloro e o tempo de contato em alguns tratamentos selecionados. Os tratamentos utilizados foram com dose de cloro de 0,5, 1 e 2 mg L⁻¹ nos tempos de contato de 10 e 30 minutos com a concentração inicial de 100 μ g L⁻¹ de 17 β -estradiol. O tratamento estatístico utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado no qual as unidades experimentais são escolhidas de forma casual, utilizando-se somente o princípio da repetição e casualização. Para utilizar este delineamento deve-se ter homogeneidade das condições ambientais e do material experimental. Para poder avaliar simultaneamente mais de um fator, no caso dose de cloro e tempo de contato, utilizou-se da ferramenta dos experimentos fatoriais. Nesses experimentos cada nível de um fator se combina com nível do outro fator constituindo um tratamento (REIS, 2000).

O resultado mostrou que existe interação entre a dose de cloro e o tempo de contato ao nível de 5% de probabilidade. Isto significa que o comportamento de um fator depende dos níveis do outro, sendo, portanto dependentes (Apêndice - Tabela A1). Avaliou-se, assim o comportamento de um fator em cada nível do outro. Avaliou-se o efeito da dosagem no tempo de contato, (fixou-se o tempo e variou-se a dosagem de cloro) concluiu-se que o tempo não influência na remoção de 17 β -estradiol considerando a dose de cloro de 2 mg L⁻¹ e que o tempo influência na remoção do hormônio nas dosagens de cloro de 0,5 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹. (Apêndice - Tabela A2). Fixaram-se as dosagens de cloro e variou-se o tempo, e chegou-se, basicamente na mesma conclusão, no tempo de 10 min a dosagem de cloro é significativa e considerando o tempo de 30 min a dosagem de cloro não apresenta diferença significativa

entre as médias (Apêndice - Tabela A3). Por meio do teste de Tukey, constatou-se que as médias dos tratamentos no tempo de 10 min diferem entre si ao nível de 5% de significância. Por conseguinte, nestas condições, ou seja, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol, o tratamento mais indicado seria a dose de 2 mg L^{-1} com o tempo de contato de 10 min ou a dose de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ durante 30 min, para os quais o residual de 17β -estradiol foi $3,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A mesma análise estatística foi realizada para a concentração inicial de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, considerando os tempos de contato de 10 e 30 minutos e as concentrações de cloro de 0,5, 1 e 2 mg L^{-1} (Apêndice - Tabela A4). Considerando o tempo de contato como fator (fixou-se as dosagens de cloro e variou-se o tempo) para 10 min e 30 min verificou-se que existe ao menos uma média estatisticamente diferente ao nível de 5% de significância (Apêndice - Tabela A5). Constatou-se que para a dose de 2 mg L^{-1} o tempo de contato não influencia na remoção do 17β -estradiol e para as doses de 0,5 e 1 mg L^{-1} o tempo de contato influencia na remoção de E2 ao nível de 5% de probabilidade (Apêndice - Tabela A6). De acordo com o teste de Tukey, verificou-se que para o tempo de 10 min todas as dosagens de cloro (médias) diferem entre si ao nível de 5%. Para o tempo de 30 min, as médias dos tratamentos com concentração de cloro com 1 e 2 mg L^{-1} não diferem entre si, sendo diferentes da concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Portanto, o tratamento mais indicado para essas condições seria 2 mg L^{-1} 10 min, ou 1 mg L^{-1} com 30 min, com concentrações finais de 21 ng L^{-1} e 75 ng L^{-1} , respectivamente. Contudo, apesar de serem valores estatisticamente iguais o tratamento mais adequado seria o de 2 mg L^{-1} e 10 min, pois ocorreu uma maior remoção de E2 em 50 ng L^{-1} (comparado ao de 1 mg L^{-1} e 30 min), sendo este aumento na remoção relevante do ponto de vista ambiental.

Os melhores resultados para $C_0 = 100 \mu\text{g L}^{-1}$ foram: 2 mg L^{-1} e 10 min (CT = 20 mg min L^{-1}) e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 30 min (CT = 15 mg min L^{-1}). Para $C_0 = 1 \mu\text{g L}^{-1}$ foram: 2 mg L^{-1} 10 min (CT = 20 mg min L^{-1}) e 1 mg L^{-1} 30 min (CT = 30 mg min L^{-1}). De acordo com os resultados, percebe-se que, nem sempre, um aumento no valor do CT representa um aumento na eficiência de remoção do hormônio. Portanto, para a remoção do 17β -estradiol esta forma para análise dos dados não seja a mais adequada.

A remoção de 17β -estradiol foi dependente da concentração inicial desse hormônio, pois quanto menor a concentração inicial menor foi a remoção (Figura 43). Para as mesmas condições ($0,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ e 10 min) e considerando diferentes concentrações iniciais de 17β -estradiol com $100 \mu\text{g L}^{-1}$, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e 100 ng L^{-1} as remoções foram de 73, 47 e 39% respectivamente. Resumindo, para um C_0 de 100 ng L^{-1} e 1000 ng L^{-1} a diferença entre as duas remoções foi de 8%, já considerando a concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação à

de 100 ng L^{-1} a diferença entre as duas remoções foi de 34%. Portanto, as considerações feitas para a concentração de 1000 ng L^{-1} são mais próximas ao que ocorre no ambiente onde as concentrações estão na ordem de 100 ng L^{-1} . A maior remoção, que ocorreu com dosagem de $0,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, foi com $C_0 = 100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ no tempo de contato de 30 min (97%), logo com $C_0 = 1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, nestas mesmas condições, a remoção foi de 71% (Tabela 39). Portanto, pode-se inferir, que com $C_0 = 100 \text{ ng L}^{-1}$ e tempo de contato de 30 min espera-se uma remoção igual, ou menor a encontrada com $C_0 = 1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ 30 min (71%). Adicionalmente, a remoção com $C_0 = 100 \text{ ng L}^{-1}$ no tempo de 10 min com concentração de cloro de $0,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ foi de 40%. Deste modo, conclui-se que a concentração de cloro de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ não é suficiente para a remoção de 17β -estradiol.

Figura 43 - Remoção de 17β -estradiol na dose de $0,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ - efeito da concentração inicial de E2
* dados discretos

Tabela 39 - Remoção de 17 β -estradiol em diferentes condições de tratamento com cloro

Concentração inicial Teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração inicial- C_0 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo de Contato (min)	Cloro aplicado (mg L^{-1})	C/C_0	Remoção %	Concentração Residual – C ($\mu\text{g L}^{-1}$)
0,1	0,093	10	0,5	0,608	39	0,06
1	0,778	10	0,5	0,528	47	0,41
100	116	10	0,5	0,273	73	31,6
1	0,89	30	0,5	0,289	71	0,26
100	115	30	0,5	0,028	97	3,20
300	312	10	1	0,271	73	84,50
100	117	10	1	0,178	82	20,80
1	0,802	10	1	0,397	60	0,32
1	0,934	20	1	0,107	89	0,11
300	329	30	1	0,039	96	11,50
100	111	30	1	0,031	97	3,40
100	100	30	1	0,057	94	5,70
1	0,993	30	1	0,080	92	0,08
0,1	0,085	30	1	<LD	-	-
100	127	1	2	0,599	40	75,90
100	128	4	2	0,142	86	18,20
100	128	7	2	0,059	94	7,60
100	114	10	2	0,029	97	3,30
1	0,977	10	2	0,020	98	0,02 *
1	0,852	20	2	0,014	99	0,01 *
1	1	30	2	0,015	99	0,01 *
100	110	30	2	0,025	98	2,70
0,1	0,115	30	2	<LD	-	-
100	115	30	5	0,022	98	2,50

* amostras abaixo do LD, contudo foram dopadas e seus valores puderam ser calculados, portanto os valores são estimativas.

Na dosagem de 1 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ houve também efeito da concentração inicial do 17 β -estradiol, contudo esta diferença ocorreu apenas para a concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, não seguindo a mesma tendência da dosagem de 0,5 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, isto é, maior concentração inicial maior a remoção. A sequência de remoção foi maior com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, seguido de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ e por ultimo 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ no tempo de 10 min. Para o tempo de 30 min persistiu a afirmativa de maior concentração inicial maior a remoção (Figura 44).

A remoção para 1 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ foi de 92% para concentração inicial de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de E2 com tempo de contato de 30 min. Contudo, para a concentração de 100 ng L^{-1} a concentração de E2 foi abaixo do limite de detecção do equipamento que é de 40 ng L^{-1} . Alum et al. (2004), ao avaliarem a remoção de 17 β -estradiol com concentração inicial de 27,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ aplicando 1 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ obtiveram concentração abaixo do LD ($\text{LD} = 313 \text{ ng L}^{-1}$) em tempo de contato maior que 1,0 h, a remoção foi maior que 98,8%, um pouco acima do encontrado neste estudo que com 1 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e tempo de contato de 30 minutos foram de 92 e 94% respectivamente.

Figura 44 - Remoção de 17β-estradiol na solução com dosagem inicial de cloro de 1,0 mg Cl₂ L⁻¹ - efeito da concentração inicial de 17β-estradiol.

* dados discretos

Figura 45 - Oxidação da solução contendo 17β-estradiol em diferentes concentrações iniciais com 2,0 mg L⁻¹ de cloro.

* dados discretos

Observa-se na Figura 45 que na dosagem de cloro de 2 mg L⁻¹ também houve efeito da concentração inicial de 17β-estradiol. Todavia, observa-se que este efeito tende a diminuir com o aumento da dosagem de cloro e tempo de contato como representado na Figura 46, e que com o aumento da dosagem de cloro aumenta-se a eficiência de remoção do 17β-estradiol. Também é possível verificar o efeito da concentração, pois para uma mesma concentração de cloro e mesmo tempo de contato, há mais de três diferentes eficiências de remoção, sendo este efeito mais acentuado para a dosagem de 0,5 e 1,0 mg Cl₂ L⁻¹. Para verificar se a eficiência aumentaria em dosagens elevadas de cloro realizou-se um ensaio com concentração de 5 mg Cl₂ L⁻¹. A remoção entre as dosagens de cloro de 5 mg L⁻¹ e 2 mg L⁻¹

foram muito próximas, sendo o residual de E2 de 2,50 e 2,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Portanto, o aumento da dosagem de cloro acima de 2 mg L^{-1} não resultou em aumento na eficiência de remoção do 17 β -estradiol.

Figura 46 - Efeito da dosagem de cloro na remoção de 17 β -estradiol considerando concentrações iniciais de 17 β -estradiol

* dados discretos

Para se avaliar como o aumento do tempo de contato acima de 30 minutos influenciaria na remoção do 17 β -estradiol realizou-se um ensaio com tempo de contato de 24 h, como está demonstrado na Figura 47.

Figura 47 - Avaliação do tempo na remoção de 17 β -estradiol - 2,0 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$

* dados contínuos

Após 24 horas de tempo de contato com concentração inicial de cloro de 2,0 mg L^{-1} e concentração inicial de 17 β -estradiol 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ observou-se que a maior parte da remoção

ocorreu nos primeiros 30 min, após os quais a velocidade de reação diminuiu. Após 12 horas de contato com cloro a concentração de 17β -estradiol diminuiu para $135,7 \text{ ng L}^{-1}$ e depois de 24 h de tempo de contato a concentração ficou abaixo do LD (Figura 47).

A remoção do 17β -estradiol com o cloro em concentração de $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, no primeiro minuto foi de 40%, após 7 min esta remoção foi de 94%, com 10 min foi de 97%, 30 min foi de 98% de remoção e depois deste tempo a remoção foi lenta chegando a 99,8% após 12 horas de reação.

Tentou-se ajustar os resultados às reações de primeira, segunda e pseudo-primeira ordem, contudo em nenhum dos casos o ajuste foi adequado. A velocidade de reação diminuiu após o tempo de contato de 10 min (Figura 48).

Figura 48 - Variação da concentração de 17β -estradiol com o tempo de contato para dosagem de cloro de $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ - concentração inicial de 17β -estradiol de $100 \mu\text{g L}^{-1}$

* dados contínuos

Deborde et al. (2004), em estudo sobre a cinética de oxidação do 17β -estradiol com cloro, obtiveram reação de segunda ordem, contudo considerando diferentes valores de pH e tempos de contatos menores que os usados nesta pesquisa. Deborde et al. (2004) concluíram que após 15 min de tempo de contato com concentração de cloro de 2 mg L^{-1} e pH de 7 a 8 seria possível obter 95% de remoção para o estrógeno estudado, o que também foi obtido neste estudo para a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e tempo de contato de 7 min. Contudo, ressalvas devem ser feitas para concentrações iniciais na ordem de ng L^{-1} de 17β -estradiol, pois a remoção pode ser baixa. Como exemplo, neste estudo em que se avaliou o tempo de contato máximo de 24 h e dosagem de cloro inicial de $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, após 8 horas de reação a concentração de 17β -estradiol era de $484,3 \text{ ng L}^{-1}$. Se esta for considerada como concentração

inicial, e a dose de cloro neste tempo de contato que era de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, houve remoção de apenas 72% após as próximas 4 h de tempo de contato, chegando a uma concentração final de 136 ng L^{-1} de 17β -estradiol.

Westerhoff et al. (2005), avaliando a remoção de 17β -estradiol, chegaram à remoção de aproximadamente 100% (as concentrações nas amostras estavam abaixo do LD) para as condições de concentração inicial de 10 a 250 ng L^{-1} e concentração inicial de cloro de 3,8 a $3,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ o que condiz com o ensaio realizado neste estudo após 24 horas.

Chen et al. (2007), com concentração inicial de 100 ng L^{-1} , obtiveram remoções na ordem de 20% de 17β -estradiol com cloro a 1 mg L^{-1} (pré-cloração) com 10 minutos de tempo de contato e para concentração de 500 ng L^{-1} a remoção foi de 40%. Para a pós-cloração a remoção foi de 23% e 36% para as concentrações de 100 e 500 ng L^{-1} , respectivamente, nas mesmas condições. Para todo o processo de tratamento de água, pré-cloração, coagulação/sedimentação, filtração, pós-cloração a remoção obtida foi de 89% e 90% para 100 e 500 ng L^{-1} , respectivamente.

Gerolin (2008), estudando a presença de 17β -estradiol em amostras de duas ETAs na entrada e na saída das estações de tratamento de água, encontrou 17β -estradiol na concentração de 5,25; 6,66 e $7,27 \text{ ng L}^{-1}$ em uma das ETAs e ao final do tratamento a remoção total foi de 71,8; 84,7 e 80%. Essa estação de tratamento, situada no Brasil possui cloração com concentração de 2,5 a $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro residual dependendo do dia. Na outra ETA a concentração inicial foi de 3,0; 4,31 e $9,07 \text{ ng L}^{-1}$ de 17β -estradiol, com remoção de 74, 78 e 88,4%, com cloro residual de 3,3 a $3,9 \text{ mgCl}_2 \text{ L}^{-1}$, dependendo do dia, sendo que está ETA possui pré e pós-cloração e ainda a adição de carvão ativado. A concentração final de 17β -estradiol das duas ETAs estão na ordem de 1,48 a $0,78 \text{ ng L}^{-1}$. Considerando apenas as remoções encontradas neste estudo, 92% - $1 \text{ mgCl}_2 \text{ L}^{-1}$ e 30 min- e 99% - $2 \text{ mgCl}_2 \text{ L}^{-1}$ e 30 min, e se afluente a ETA se encontre uma concentração de 10 ng L^{-1} , valores comumente encontrados em águas superficiais (BENOTTI et al., 2009; CHEN et al., 2007; SODRÉ et al., 2007), a concentração final na água tratada seria de 0,8 e $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ respectivamente, o que em teoria condiz com o encontrado por Gerolin (2008).

Acompanhou-se conjuntamente com a degradação do 17β -estradiol a remoção de COT (Tabela 40). Avaliou-se que após 24 horas de contato com cloro houve remoção de 38% de COT. A concentração de COT estava elevada considerando as características da água analisada, provavelmente este parâmetro pode ter sofrido interferência devido a adição das cepas de *E.coli* juntamente com o meio de cultura da mesma, o que levou a um aumento no COT.

Tabela 40 - Dados da remoção de COT ao longo do tempo ($C_0 = 100 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17 β -estradiol)

Tempo (h)	COT (mg L^{-1})	% Remoção	Cloro Total (mg L^{-1})
0	327,1	0	2,00
0,5	375,0	-14,6	1,80
1	307,0	6,1	1,77
4	292,8	10,5	1,46
8	275,5	15,8	1,46
12	263,7	19,4	1,33
24	204,1	37,6	0,95

Para a confirmação dos subprodutos formados pelo cloro, realizou-se um ensaio com a concentração de 500 ng L^{-1} como explicado no Item 4.2.2.2 como tratamento D. Apesar deste ensaio ter sido desenvolvido e realizado com outro intuito os dados obtidos serão usados para enriquecer e acrescentar a discussão deste tópico, principalmente devido ao baixo limite de detecção propiciado pelos equipamentos utilizados (LC/MS/MS).

Na Figura 46 o tratamento com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ foi o único que não foi realizado sob as mesmas condições que as outras dosagens de cloro, isto é, a água utilizada neste ensaio foi água deionizada. O fato de se ter utilizado uma matriz diferente pode ter sido a causa de dois fatores: o primeiro deles em se obter remoções da mesma magnitude da obtida nos ensaios com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, o que de fato pode ter sido causado pela concentração inicial utilizada ser menor - 500 ng L^{-1} - e/ou pelo aumento da dose de cloro para $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. O segundo ponto a ser levantado é que no ensaio realizado com 24 h, quando a dosagem de cloro chegou a $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ após 4 h de tempo de contato a remoção foi de 72%, se comparado a 95,5% de remoção obtida por $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ com 2 h de tempo de contato em água deionizada (Tabela 41), sendo a eficiência na degradação bastante inferior.

Alguns fatores devem ser considerados em relação a este ensaio. O primeiro é que a concentração inicial de 17 β -estradiol no ensaio D é mais próxima à encontrada em águas superficiais, isto é, concentração inicial de 500 ng L^{-1} . Contudo, apresenta uma matriz muito limpa, sem interferentes e competidores para com o oxidante, o que pode ter sido a causa da alta eficiência demonstrada neste ensaio. No entanto, considerando o ensaio com concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (tempo total do ensaio de 24 h), deve-se levar em conta que esta é uma concentração extremamente elevada, que não ocorre no ambiente. Todavia, a matriz considerada ($C_0 = 100 \mu\text{g L}^{-1}$) é uma matriz mais próxima da realidade com interferentes, competidores e microrganismos os quais influenciam a cinética de reação do cloro, com isso levando a uma menor eficiência de remoção. Uma terceira possibilidade e/ou fator combinado para a diminuição na remoção é que devido à concentração inicial elevada, pode-se ter gerado muitos subprodutos da degradação e estes competirem com o 17 β -estradiol

levando a diminuição da remoção.

Analisando o tratamento D separadamente (Tabela 41) averigua-se que no tempo de contato usualmente utilizados em ETAs, isto é 30 min, com concentração de cloro de 1,5 mg L⁻¹ a degradação de E2 foi de 93,5%, com um residual de 32 ng L⁻¹. Mesmo com o aumento do tempo de contato para 24 h a remoção foi de 99,6% com o residual de E2 na concentração de 1,8 ng L⁻¹, residual este capaz de induzir efeitos deletérios em organismos aquáticos.

A concentração de E2 chegou ao seu mínimo, isto é, maior remoção após 1 dia de tempo de contato. Depois do primeiro dia houve um aumento gradativo até o oitavo dia, no décimo segundo dia a concentração diminuiu novamente e ao fim do experimento (16 dias) verificou-se um considerável aumento na concentração de 17β-estradiol. As possíveis causas para este comportamento pode ser por falha na análise, coleta ou contaminação no final do experimento. Também pode ser devido à forma como o experimento foi conduzido, isto é em 4 béqueres preenchidos com a mesma água e mesma concentração, sendo as quatro primeiras alíquotas sendo retiradas no primeiro béquer, as quatro seguintes alíquotas no segundo béquer e assim consecutivamente até o termino do experimento. A terceira possibilidade seria o reaparecimento de 17β-estradiol, o que alguns autores já observaram (HUBER et al., 2004), seja pela formação de dímeros (SEGMULLER et al., 2000), ou pela própria degradação dos produtos gerados. No entanto, para confirmar qualquer destas hipóteses teria que se repetir o experimento, para uma melhor avaliação destes resultados. O que não foi possível devido à limitação do tempo do doutorado sanduíche.

Tabela 41 - Tratamento D com cloro 1,5 mg Cl₂ L⁻¹ e C₀ = 500 ng L⁻¹ de E2

Tempo	E2 ng L⁻¹	% remoção de E2	Cloro residual Total mg L⁻¹
0	422,8	0	1,50
10 min	55,6	88,8	1,35
30 min	32	93,5	1,29
60 min	96,7	80,5	1,28
2 h	22,1	95,5	1,28
6 h	8	98,4	1,19
8 h	5,8	98,8	1,16
12 h	2,5	99,5	1,11
24 h	1,8	99,6	0,98
2 dias	2,3	99,5	1,07
4 dias	6,3	98,7	0,78
7 dias	9	98,2	0,68
8 dias	34	93,1	0,46
12 dias	16	96,8	0,34
16 dias	241,6	51,2	0,14

5.3.2 Oxidação do Estrona

A caracterização da água, antes e após os tratamentos com cloro, está apresentada na Tabela 42. Durante os tratamentos a temperatura variou de 17 a 19 °C. Não houve variações para a maioria dos parâmetros analisados, com exceção para a condutividade que teve uma maior variação, quanto maior a dose de cloro aplicada maior foi a condutividade. Todos os parâmetros analisados condizem com uma água tratada após a etapa de filtração com cor e turbidez baixa.

Tabela 42 - Variáveis analisadas no início e no fim dos tratamentos com cloro para oxidação de estrona

Variável	Média (DP) (n = 5)	
	Início	Final
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	26 ± 4	26 ± 2
Alcalinidade parcial (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	18 ± 3	16 ± 2
Condutividade (mS cm ⁻¹)	73 ± 28	181 ± 46
Cor (uH)	0,8 ± 1	0,8 ± 1
pH	7,1 ± 0,2	6,7 ± 0,1
Turbidez (UT)	0,42 ± 0,1	0,42 ± 0,1

DP: Desvio Padrão; n = número de amostras

O pH inicial da água (pH 7,1) favoreceu a formação de ácido hipocloroso que esteve presente em aproximadamente 70% do cloro total (WEF, 1996). Essa predominância de ácido hipocloroso promoveu maior inativação dos microrganismos indicadores o que está coerente com os resultados apresentados na Tabela 43. Houve uma remoção de 3 log de *E. coli* na menor concentração aplicada com CT 10 mg min L⁻¹ (Tabela 43).

Tabela 43 - Inativação de *E. coli* e coliformes totais na oxidação de estrona na presença de cloro

Cloro (mg L ⁻¹)	Tempo contato (min)	CT (mg min L ⁻¹)	<i>E.coli</i>		Coliformes totais final		
			inicial UFC/100 mL	final UFC/100 mL	trat 1	trat 2	trat 3
6,4	30	192	13 x10 ³	0	0	0	2
2	30	60	13 x10 ³	0	0	0	0
1	30	30	18 x10 ³	0	0	0	1
2	10	20	30 x10 ³	0	0	0	0
1	10	10	16 x10 ³	0	0	1	60

Trat: tratamento

Para se alcançar a eficiência de remoção recomendada para a desinfecção da água após a etapa de filtração (tratamento convencional), é necessário atingir 0,5 log de remoção para *Giardia* e 2 log para vírus (USEPA, 1999). Para inativação de 2, 3 e 4 log de vírus é

necessário CT de 3, 4 e 6 mg min L⁻¹ respectivamente. Todas as doses e tempos de contato utilizados atendem ao requisito, para vírus. Todavia, para cisto de *Giardia* o CT necessário para alcançar 0,5, 1,5 e 3 log de remoção é de 17, 52 e 104 mg min L⁻¹ respectivamente. Portanto só o tratamento com CT de 10 mg min L⁻¹, não atende ao requisito para a *Giardia* (Tabela 43).

De acordo com a Portaria MS 518 (BRASIL, 2004), os tratamentos com CT de 192, 30 e 10 não estariam em concordância com a mesma, considerando o padrão de coliformes totais para sistemas que analisassem uma quantidade menor do que 40 amostras no mês. Contudo, há uma possibilidade de contaminação principalmente nas amostras com CT de 192 e 30 onde de 3 tratamentos realizados apenas 1 deles apresentou coliformes totais. Para CT de 10 mg min L⁻¹ dois dos três tratamentos apresentam coliformes totais, o que reforça que está concentração não foi suficiente para a eliminação dos coliformes totais (Tabela 43). A desinfecção com dose de 6,4 mg Cl₂ L⁻¹, embora apresente boa eficiência de inativação de coliformes totais e *E.coli* não poderá ser usada, pois a concentração de cloro residual é maior que o máximo aceitável pela legislação brasileira para água potável e poderia causar rejeição ao consumo desta água pela população atendida (Tabela 44).

Tabela 44 - Concentração das diferentes formas do cloro durante os tratamentos

Tempo min	Cloro inicial (mg L ⁻¹)		Cloro final residual (mg L ⁻¹)		
	livre	livre	total	combinado	demanda de cloro
10	2	1,7	1,9	0,2	0,3
30	2	0,8	1,1	0,2	1,2
10	1	0,4	0,8	0,4	0,6
30	1	0,5	0,6	0,1	0,5
30	6,4	5,5	5,8	0,3	0,9

A concentração inicial de estrona para todos os tratamentos foi de 100 µg L⁻¹ devido ao limite de detecção da metodologia utilizada ser de 1 µg L⁻¹. A degradação do estrona pelo cloro está apresentada na Tabela 45. A remoção variou de 95 a 97% com os tempos de contato e doses utilizadas, com exceção da dose de 1 mg Cl₂ L⁻¹ e tempo de contato de 10 minutos em que a remoção foi de 44%. Portanto, sistemas de tratamento de água para abastecimento que utilizam concentração de cloro de 1mg Cl₂ L⁻¹ com o tempo de 10 minutos, não são suficientes para a remoção de estrona, se este estiver presente na água com concentrações na ordem de 100 µg L⁻¹. Em geral, a velocidade de remoção de um analito diminui com a diminuição de sua concentração, seguindo uma cinética de primeira ordem. Devido a este fato, pode-se inferir que a dose de 1mg Cl₂ L⁻¹ e tempo de contato de 10 min não são adequados para a remoção de estrona em ETAs, nas quais as concentrações de estrona

encontradas estão abaixo da concentração analisada. Em concordância com o exposto, em estudo realizado no Brasil foi detectado estrona na água afluenta (bruta) à ETA em concentração de $11,6 \text{ ng L}^{-1}$ e após o tratamento, no qual havia cloração, a concentração de estrona foi reduzida para $0,1 \text{ ng L}^{-1}$. No mesmo estudo, em outra ETA em que era utilizada a cloração e cuja água bruta continha estrona em concentração média de $0,41 \text{ ng L}^{-1}$ (3 coletas), a concentração na água tratada foi reduzida a $0,08 \text{ ng L}^{-1}$. As remoções de estrona nas duas ETAs foram de 99,1 e 80,5%, respectivamente. Nessas duas ETAs as doses de cloro eram maiores que $2,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ (GEROLIN, 2008).

Chen et al. (2007), com concentração inicial de estrona de 100 ng L^{-1} , obtiveram remoções da ordem de 34% de estrona com cloro a 1 mg L^{-1} com 10 minutos de tempo de contato e para concentração de 500 ng L^{-1} a remoção foi de 35%, para a pré-cloração. Para a pós-cloração a remoção foi de 28% e 26% para as concentrações de 100 e 500 ng L^{-1} , respectivamente, nas mesmas condições. Para todo o processo de tratamento de água, pré-cloração, coagulação/sedimentação, filtração, pós-cloração a remoção encontrada foi de 95% e 91% para 100 e 500 ng L^{-1} , respectivamente.

A concentração de estrona na água tratada com cloro, mesmo para as altas eficiências de remoção, de 95 a 97%, permaneceu acima de $2,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, o que afetaria a vida aquática se lançado no meio ambiente. O aumento da concentração de cloro não resultou em aumento da remoção de estrona, considerando o tempo de 30 min, como observado para as doses de 1,0; 2,0 e $6,4 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 45). A maior remoção de COT, de 1,7%, ocorreu para a dose de $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ e tempo de contato de 30 min.

Tabela 45 - Degradação de estrona na presença de cloro

Concentração de cloro mg L^{-1}	Tempo (min)	Remoção% Estrona	Concentração final Estrona $\mu\text{g L}^{-1}$	Remoção % COT
1	10	44	60,7	0,9
	30	95	5,4	0
2	10	96	4,0	1,0
	30	95	5,3	1,7
6,4	30	97	2,8	0,1

Na Figura 49 pode-se verificar que o tempo e a dose afetam a remoção de estrona. Contudo para confirmar este fato foi feita uma análise estatística dos resultados.

Figura 49 - Remoção de estrona em diferentes tempos de contato e doses de cloro

* dados discretos

A análise estatística foi feita para avaliar se havia diferença significativa na remoção do estrona considerando a variação da dose de cloro e do tempo de contato. Os tratamentos utilizados foram com a dose de cloro de 1 e 2 mg L⁻¹ nos tempos de 10 e 30 minutos com a concentração inicial de 100 µg L⁻¹ de estrona. O tratamento estatístico utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado como supracitado no item anterior (REIS, 2000).

O resultado foi que existe interação entre a dose de cloro e o tempo de contato ao nível de 5% de probabilidade (Apêndice - Tabela A7). Isto significa que o comportamento de um fator depende dos níveis do outro, sendo, portanto dependentes. Avaliou-se, assim o comportamento de um fator em cada nível do outro. Avaliou-se que o tempo não influencia na remoção de estrona considerando a dose de cloro de 2 mg L⁻¹ e tempos de 10 e 30 min. Para a concentração de cloro de 1 mg L⁻¹ o tempo influencia na remoção de estrona considerando os tempos de 10 e 30 min (Apêndice - Tabela A8).

No tempo de 10 min, a dose de cloro influencia na remoção do hormônio. Para o tempo de 30 minutos a dose de cloro não influencia na remoção do hormônio (Apêndice - Tabela A9). Por conseguinte, nestas condições, ou seja, 100 µg L⁻¹ de estrona o tratamento mais indicado seria a dose de 2 mg Cl₂ L⁻¹ com o tempo de 10 minutos ou a dose de 1 mg Cl₂ L⁻¹ durante 30 minutos.

O aumento da dose de cloro (6,4 mg L⁻¹) não resultou em aumento na remoção de estrona, decidiu-se então avaliar se o aumento do tempo de contato levaria ao aumento na remoção de estrona e qual o tempo para que o estrona fosse removido até que a concentração remanescente não fosse detectada.

A avaliação foi realizada aplicando-se 2 mg Cl₂ L⁻¹ em tempo de contato de 24 h, conforme resultados apresentados na Tabela 46. Após 8 horas a concentração de estrona ficou

abaixo do limite de detecção, que para o método analítico utilizado é de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, o que não significa que o estrona foi totalmente removido. A velocidade de remoção de estrona diminuiu após o tempo de contato de 1,0 h. A velocidade de remoção de COT nas primeiras 4 horas foi pequena, aumentando após esse tempo atingindo remoção final de 33% em 24 h, o que indica que mesmo após 24 horas ainda há a possibilidade de subprodutos do estrona estarem na água de estudo. Esse resultado possibilita inferir que mesmo com tempo de contato extenso proporcionado pela rede de distribuição de água ainda há a possibilidade de haver subprodutos do estrona, se este estiver presente na água que sai da ETA. LEE et al. (2004) avaliaram a atividade estrogênica com leveduras (YTA) com ER de ratos e co-ativador TIF2, e após 10 min de tempo de contato e dose de $1,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ não houve redução significativa da atividade estrogênica com concentração inicial de $27 \mu\text{g L}^{-1}$. A completa eliminação da toxicidade só foi atingida após 36 h de tratamento, sendo a eliminação do potencial da atividade estrogênica altamente dependente do tempo (LEE et al., 2004). O que está de acordo com a possibilidade de formação de subprodutos mesmo após um elevado tempo de contato.

Tabela 46 - Degradação de estrona com $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, tempo de contato de 24 horas e $C_0 = 100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tempo (h)	Concentração final E1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Remoção % E1	Cloro residual total (mg L^{-1})	COT (mg L^{-1})	Remoção% COT
0	88,1	0	2,0	291	0
1	2,2	97	1,9	297	0
4	2,0	98	1,6	290	0
8	1,0 - 1,5	-	1,5	275	5
12	<1,0	-	1,3	258	11
24	<1,0	-	0,8	194	33

LD = $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, LQ = $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$

Em concordância com o exposto Westerhoff et al. (2005), após 24 h de oxidação com cloro ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$), obtiveram remoções de estrona próximas a 100% (pH 5,5). Nakamura et al. (2007), estudando a formação de subprodutos, obtiveram remoção de estrona próxima a 70% após 15 min não alterando até 60 min de tempo de contato com cloro na concentração de 1 mg L^{-1} , pH 7 e concentração inicial de estrona - 2 mg L^{-1} . A diferença entre os resultados encontrados neste estudo e o de Nakamura et al. (2007) pode ser devido ou a concentração inicial de estrona (2 mg L^{-1} e neste estudo $100 \mu\text{g L}^{-1}$) ou devido a diferenças na temperatura que não foi encontrada no referido trabalho.

Na Tabela 47 está apresentado o estudo realizado com a finalidade de se verificar a formação de subprodutos do estrona, no entanto como o composto E1 foi monitorado os resultados foram incluídos neste tópico. Após 30 min de tempo de contato a remoção foi de

91%, com um residual de E1 de 48 ng L^{-1} , tempo este comumente utilizado em ETAs. Após 24 h a remoção alcançou 97,5% com um residual de E1 de $12,5 \text{ ng L}^{-1}$. Houve variações de E1 durante a execução do tratamento e somente após 5 dias de contato com cloro que este apresentou valores continuamente abaixo 10 ng L^{-1} , sendo que após 16 dias ainda um residual de E1 ainda estava presente $6,2 \text{ ng L}^{-1}$. Confirmando novamente que o estrona é um composto de difícil degradação e que mesmo após um tempo de contato elevado e uma concentração inicial baixa ($C_0 = 500 \text{ ng L}^{-1}$) a total eliminação do composto não foi alcançada. Destacando que este estudo foi realizado em uma matriz totalmente limpa (água para cromatografia - HPLC), isto é livre de interferentes.

Tabela 47 - Tratamento D com cloro $1,5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ e $C_0 = 500 \text{ ng L}^{-1}$ de E1

Tempo	E1 ng L^{-1}	% remoção de E1	Cloro residual Total mg L^{-1}
0	495,3	0	1,50
10 min	142,3	71,3	1,37
30 min	44,3	91,1	1,38
60 min	47,7	90,4	1,25
2 h	38,1	92,3	1,28
4 h	31,9	93,6	1,24
8 h	38,1	92,3	1,23
12 h	168,8	65,9	1,20
24 h	12,5	97,5	1,16
2 dias	12,9	97,4	1,03
3 dias	5,6	98,9	0,89
4 dias	47,6	90,4	0,76
5 dias	2,6	99,5	0,62
6 dias	5,8	98,8	0,34
7 dias	1,2	99,8	0,31
12 dias	7,0	98,6	
16 dias	6,2	98,7	

5.3.3 Eficiência do cloro na remoção dos hormônios – Comparação entre estrona e 17β -estradiol

Na Figura 50 pode-se verificar que a oxidação utilizando o cloro foi mais eficiente na remoção de 17β -estradiol do que estrona, isto é a velocidade de remoção é mais rápida para o 17β -estradiol do que para o estrona, mesmo que a diferença entre elas seja pequena. A persistência do 17β -estradiol em relação ao estrona é maior devido ao LD do equipamento ser maior para o estrona, isto é uma concentração menor é detectada para o composto 17β -

estradiol. Em concordância com o exposto quando a concentração inicial do hormônio foi menor ($C_0 = 500 \text{ ng L}^{-1}$), o mesmo efeito foi observado com uma maior de remoção para o 17β -estradiol do que para o estrona (Figura 51).

Figura 50 - Remoção de estrona e 17β -estradiol – concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e 2 mg L^{-1} de cloro.

* dados contínuos

Figura 51 - Remoção de estrona e 17β -estradiol – concentração inicial de 500 ng L^{-1} e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro.

* dados contínuos

5.3.4 Ensaio de ecotoxicidade - Oxidação do 17 β -estradiol por meio do cloro

Para a validação do teste de ecotoxicidade alguns parâmetros devem ser seguidos. O volume de solvente, neste caso metanol, ser menor que 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ em cada ensaio. A água de diluição, ou neste caso chamada de água de reconstituição deve estar livre de contaminantes. A temperatura entre os ensaios não deve variar $\pm 1,0\%$ e a temperatura no ambiente deve estar em 25 ± 2 °C. Deste modo, todas essas condições foram atendidas durante a realização do teste de ecotoxicidade.

O pH deve estar entre 6,5 e 8,5 durante os ensaios e não deve possuir um desvio maior que $\pm 0,5$ unidades para um mesmo tratamento. Todas as médias de tratamentos estão dentro do pH recomendado. Contudo, apenas duas leituras, uma em cada tratamento, não respeitaram a premissa referente ao pH e resultaram em uma variação maior que $\pm 0,5$ unidades, estando marcados em vermelho na Tabela 48. O OD nunca deve estar abaixo de 4,9 mg L^{-1} fato este que não ocorreu em nenhum dos tratamentos (Tabela 48).

Tabela 48 - Média dos valores de pH e OD nos diferentes tratamentos, medidos nos dias 15/04/2010, 21/04/2010 e 06/05/2010.

Tratamentos	OD (mg L^{-1})		pH	
	Média (n = 3)	DP	Média (n = 3)	DP
Controle da água de reconstituição	6,6	0,5	7,5	0,4
Controle do cloro	6,7	0,2	7,2	0,2
Controle do solvente (meOH)	6,8	0,7	7,4	0,0
Controle E2	6,1	0,6	7,3	0,2
Sem tratamento Inicial - 1 $\mu\text{g L}^{-1}$	6,4	0,3	7,1	0,1
1 $\mu\text{g L}^{-1}$ - 25% de água tratada	6,3	0,7	7,3	0,1
1 $\mu\text{g L}^{-1}$ - 50% de água tratada	6,5	0,4	7,3	0,1
1 $\mu\text{g L}^{-1}$ - 75% de água tratada	6,6	0,6	7,2	0,0
1 $\mu\text{g L}^{-1}$ - 100% de água tratada	6,4	0,6	7,2	0,3
Sem tratamento Inicial - 100 ng L^{-1}	6,8	0,3	6,9	0,9
100 ng L^{-1} - 25% de água tratada	6,9	0,4	6,9	1,0
100 ng L^{-1} - 50% de água tratada	6,8	0,3	7,3	0,1
100 ng L^{-1} - 75% de água tratada	6,9	0,4	7,2	0,1
100 ng L^{-1} - 100% de água tratada	6,9	0,2	7,2	0,3

É recomendado que as substâncias em análise sejam quantificadas no início, semanalmente e ao final dos experimentos. No entanto, como as condições escolhidas para este ensaio, isto é, concentração inicial de 17 β -estradiol, tempo de contato e dose de cloro, foram as condições onde não se detectou a presença do 17 β -estradiol pelos métodos

disponíveis naquele período, isto é, limite de detecção de 40 ng L^{-1} , não foi possível a quantificação das amostras cloradas como pode ser apurado no item 5.3.2.

Na Tabela 49 estão apresentados o cloro residual livre após o tempo de contato estabelecido para os diferentes tratamentos. Observa-se que o consumo de cloro aumentou com o aumento da concentração inicial de hormônio aplicado. O peso e números de animais por grupo no início e no final dos tratamentos estão apresentados no apêndice na Tabela A10.

Tabela 49 - Cloro residual livre após 30 min de tempo de contato

Tratamento	Cloro residual livre (mg L^{-1})	
	Média (n = 11)	DP
Controle do cloro	2,0	0,2
após tratamento 100 ng L^{-1}	1,9	0,3
após tratamento $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	1,8	0,1

Durante os ensaios foi observado o comportamento dos peixes e alterações físicas. O ensaio com controle positivo de 17β -estradiol na concentração de $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ apresentou manchas vermelhas ao longo do comprimento dos peixes, como demonstrado na Figura 52A e 52B. Este fato foi observado, em geral, dias antes da morte dos respectivos peixes, podendo estar ligado a possíveis hemorragias internas. Considerando que uma mortalidade como esta não foi observada em nenhum outro ensaio e que os parâmetros analisados não apresentaram variações que justifiquem esta mortandade (Tabela 48), a causa provável da alta mortalidade pode ser a exposição dos peixes a uma concentração elevada de 17β -estradiol ($50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Com exceção do tratamento com $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, apenas mais dois peixes morreram, um no ensaio com 50% de água tratada (concentração inicial de E2 de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e o outro no tratamento com 50% de água tratada com concentração inicial de E2 de 100 ng L^{-1} .

Figura 52 - Peixes doentes do tratamento controle de E2 com $50 \mu\text{g L}^{-1}$

Na Figura 53 está exposta a curva acumulada da mortalidade ao longo do tratamento com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol, ao fim do experimento 78% dos peixes haviam morrido. A mortalidade de 50% dos peixes ocorreu no décimo sétimo dia de ensaio, sendo que o início da mortandade ocorreu no oitavo dia. Portanto, comprovando que uma exposição prolongada, acima de 7 dias, a uma concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol, leva a morte de peixes, neste caso da espécie *Danio rerio*, e a danos visíveis de possíveis sangramentos, que em geral, aparecem dois dias antes da morte do peixe.

Figura 53 - Porcentagem da mortalidade acumulada durante os 21 dias de ensaio do tratamento controle positivo com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de E2.

Para a quantificação da proteína VTG havia a disponibilidade de apenas 1 placa com 96 poços. Por conseguinte, algumas escolhas tiveram que ser feitas, dentre elas a diluição das amostras. O manual do Kit ELISA recomenda usar as seguintes diluições 1:500, 1: 30000 e 1: 1800000. Para a escolha das diluições baseou-se na experiência de experimentos realizados anteriormente no laboratório. Portanto, optou-se pela diluição dos machos em 1:500 e alguns foram repetidos sem diluição e das fêmeas em 1: 1800000. Na Figura 54 está demonstrada a placa com as amostras e com a curva de calibração após todo o procedimento descrito no Kit ELISA e pronta para a leitura a 492 nm. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e a descrição completa da disposição dos poços está demonstrada na Tabela 50.

Figura 54 - Placa de leitura com as amostras após todo o procedimento para a detecção da proteína VTG

Tabela 50 - Distribuição da curva de calibração, machos e fêmeas nos poços da placa de leitura do kit ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Br	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
B	Br	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
C	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
D	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
E	F13	F14	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
F	F13	F14	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
G	M11	M12	M13	M14	M1*	M2*	M3*	M4*	M5*	M6*	M7*	M8*
H	M11	M12	M13	M14	M1*	M2*	M3*	M4*	M5*	M6*	M7*	M8*

Br: Branco, C: ponto da curva de calibração, M: macho, F: fêmea, M*: machos sem diluição

Considerando os princípios de exatidão e precisão foi necessário a construção de duas curvas de calibração, uma com concentração elevada 0,97 a 125 ng VTG mL⁻¹ (Figura 55) e outra contemplando concentrações mais baixas de a 0,48 á 31,25 ng VTG mL⁻¹ (Figura 56).

Figura 55 - Curva de calibração contemplando a concentração de VTG de 0,97 a 125 ng mL⁻¹

Figura 56 - Curva de calibração contemplando a concentração de VTG de 0,48 a 31,25 ng mL⁻¹

Os cálculos, considerando a curva mais adequada, foi realizado para cada amostra e os resultados estão apresentados na Tabela 51. Algumas amostras, principalmente do grupo das fêmeas, a diluição foi muito alta e portanto, a análise destes resultados foi comprometida. Para o grupo dos machos alguns problemas também foram encontrados, tais como: a concentração de VTG nos peixes do ensaio com água de reconstituição mostrou-se elevado e a concentração de VTG nos peixes expostos no ensaio com 100 ng L⁻¹ 25% de água tratada um valor discrepante dos demais deste grupo.

Tabela 51 - Concentração de VTG nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Fêmeas (n = 2) ng VTG mL⁻¹	Machos (n = 2) ng VTG mL⁻¹
água de reconstituição	11654081,6	6808,7
controle cloro	ND	252,6
controle solvente	ND	2892,9
Início 100 ng L ⁻¹	1184693,9	42790,8
100 ng L ⁻¹ 100%	4858163,3	5673,5
100 ng L ⁻¹ 75%	ND	38,3
100 ng L ⁻¹ 50%	817346,9	37,4
100 ng L ⁻¹ 25%	ND	22255,1
Início 1 µg L ⁻¹	37368367,4	45596,9
1 µg L ⁻¹ 100%	ND	35520,4
1 µg L ⁻¹ 75%	1046938,8	33734,7
1 µg L ⁻¹ 50%	ND	1081,6
1 µg L ⁻¹ 25 %	ND	380,1

ND: não detectado

Para tentar chegar a resultados confiáveis algumas combinações e variações foram realizadas. Primeiro levou-se em consideração todos os tratamentos para a análise estatística. Depois no grupo dos machos, analisou-se o controle cloro, controle solvente, início 100 ng L⁻¹, início 1 µg L⁻¹, 100 ng L⁻¹ 100% tratado e 1 µg L⁻¹ 100% tratado separadamente dos demais devido a não se ter utilizado água de reconstituição na sua preparação. Consequentemente, estes foram analisados comparando-se o tratamento no início e 100% tratado com os controles do solvente e do cloro. Para as fêmeas o único controle que não saiu fora da diluição foi o da água de reconstituição e quando possível este foi utilizado como grupo controle.

O intuito deste ensaio foi verificar se as amostras contendo o hormônio 17β-estradiol depois de cloradas apresentariam ainda efeito estrogênico. Iniciou-se então os tratamentos estatísticos. Primeiramente serão discutidos os resultados das amostras do ensaio com 1 µg L⁻¹ - machos. Dois cenários foram feitos: todos os dados comparando-se com o grupo controle, intitulado água de reconstituição, e todos os dados em relação ao controle do solvente. A análise estatística foi realizada com o auxílio de um software de análises estatísticas. Realizou-se a ANOVA e comprovou-se em ambos os cenários que havia pelo menos uma média estatisticamente diferente das demais ao nível de 5% de significância. Realizou-se também um teste para verificar se as amostras tinham uma distribuição normal e se tinham variância homogênea (teste de Barlett), sendo que nos dois cenários a hipótese nula foi aceita, isto é as amostras seguiram uma distribuição normal e homogeneidade na variância.

A comparação entre os tratamentos em relação ao grupo controle foi feita por meio do

teste de Dunnett. Nos dois cenários propostos o resultado foi o mesmo, os tratamentos $1 \mu\text{g L}^{-1}$ início, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 100% tratado e $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 75% tratado possuem médias estatisticamente acima da média do grupo controle ($\alpha = 5\%$). Portanto, conclui-se que as amostras apresentavam efeito estrogênico após serem tratadas com 2 mg L^{-1} de cloro e tempo de contato de 30 min, sendo que, somente não se observou efeito estrogênico após essa amostra ser diluída em 50%.

No grupo com concentração inicial de 17β -estradiol de 100 ng L^{-1} foram analisados todos os tratamentos inicialmente, no entanto a hipótese nula foi recusada no teste de variância, e portanto os tratamentos não possuem a mesma variância e o teste ANOVA não pode ser utilizado. Optou-se por verificar os tratamentos em que não se utilizou a água de reconstituição, como citado anteriormente. O resultado desta nova configuração mostrou que os tratamentos possuem distribuição normal e que possuem a mesma variância (teste de Barlett), o teste foi realizado com os tratamentos, 100 ng L^{-1} início, 100 ng L^{-1} 100% tratado, controle cloro, comparando-se com o controle metanol. De acordo, com o teste de Dunnett os tratamentos são estatisticamente diferentes do grupo controle, sendo que os tratamentos 100 ng L^{-1} início e 100 ng L^{-1} 100% tratado possuem média estatisticamente acima do grupo controle e o tratamento somente com cloro possui uma média estatisticamente inferior ao grupo controle. Isto é o tratamento somente com o cloro teve um efeito negativo quanto a estrogenicidade e as amostras com concentração inicial de 100 ng L^{-1} e 100 ng L^{-1} 100% tratado, ainda possuíam algum efeito estrogênico.

Considerando apenas a remoção da concentração de VTG (Tabela 51, os valores utilizados foram divididos pelo número final de peixes, apêndice-Tabela A10), nos machos, entre o tratamento inicial $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e o tratamento $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 100% tratado observa-se que a remoção de VTG foi de 23% sendo que quando se analisou a remoção de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol com 2 mg L^{-1} e tempo de contato de 30 min analiticamente, HPLC-FLU, a remoção deste hormônio foi maior que 96%. Apesar de tal constatação é possível inferir que com concentração inicial de hormônio ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) após a cloração (2 mg L^{-1} de cloro e 30 min), possivelmente houve uma outra fonte que causou um efeito estrogênico, podendo ser devido à possível formação de subprodutos do 17β -estradiol após a cloração que possuem efeito estrogênico. A mesma avaliação foi feita para a concentração inicial de hormônio com 100 ng L^{-1} e verificou-se que a diminuição da concentração de VTG foi de 91%, contudo para esta amostra não possuímos a remoção alcançada analiticamente devido ao limite de detecção do aparelho utilizado.

As amostras do grupo das fêmeas, amostras possíveis de serem analisadas no grupo de concentração inicial de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, as médias entre os tratamentos não diferem entre si ao nível

de 5% de significância (ANOVA). Para as amostras com concentração inicial de hormônio de 100 ng L^{-1} das amostras possíveis de serem analisadas, após verificar que possuem uma distribuição normal e possuem a mesma variância, verificou-se que todos os tratamentos obtiveram uma média estatisticamente menor em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnet. O que significa que no grupo dos peixes fêmeas as amostras cloradas afetaram negativamente à produção da proteína VTG.

5.4 Oxidação com ozônio

5.4.1 Oxidação do 17 β -estradiol

Na Tabela 52 estão apresentados os resultados do ozônio consumido, calculado utilizando a taxa de aplicação de ozônio, o tempo de contato, o off-gás e o residual de ozônio na fase líquida. O residual de ozônio na fase líquida estava sempre abaixo do limite de detecção do método Índigo (APHA, 1998) e foi desprezível no cálculo do ozônio consumido. Outra importante observação é que a taxa de aplicação do ozônio varia com o tempo de contato e com a dose de ozônio, pois o ozônio foi aplicado durante todo o tempo de contato, sendo o tempo de aplicação do ozônio o mesmo que o tempo de contato. Pode-se observar variação na taxa de aplicação de ozônio para as mesmas condições, porque os experimentos foram realizados em batelada, portanto expostos a variações como temperatura, variação de tensão da rede elétrica que alimenta o gerador e outros.

Tabela 52 - Concentração de ozônio consumido em função da taxa de aplicação de ozônio

17 β -Estradiol Concentração inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo de contato (min)	off gás (mg L^{-1})	Taxa de aplicação de ozônio ($\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Ozônio con- sumido (mg L^{-1})
100	5,0	0,48	0,05	0,23
100	5,0	0,00	0,06	0,29
1	5,0	0,48	0,11	0,54
1	5,0	0,48	0,11	0,55
100	1,0	0,00	0,62	0,62
100	1,0	0,00	0,77	0,77
0,1	1,0	0,00	0,95	0,95
0,5	5,0	0,00	0,40	2,02
0,5	5,0	0,00	0,41	2,06
100	5,0	0,00	0,81	4,05
1	5,0	0,00	1,01	5,05
100	15,0	0,48	0,81	12,21
100	30,0	2,40	0,56	16,80
100	30,0	4,80	0,75	22,80

Na Tabela 53 estão apresentadas as variáveis analisadas antes da aplicação do ozônio, demonstrando ser uma água com qualidade equivalente após a unidade de filtração em uma ETA, principalmente com relação à turbidez média de 0,45 UT.

Tabela 53 - Características da água antes da aplicação do ozônio

Variáveis	Média	Desvio Padrão (n = 13)
Alcalinidade Parcial (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	22	10
Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	32	12
Condutividade (mS cm ⁻¹)	86,1	7,5
Cor (UC)	0,7	1,2
pH	7,1	0,4
Turbidez (UT)	0,45	0,2

n = número de amostras

Durante os ensaios a temperatura variou de 17 a 22 °C, com média 19 °C e mediana de 20 °C. A inativação de *E.coli* variou de 3 a 5 log a partir da dose de 2 mg L⁻¹. O pH inicial variou de 6,6 a 7,8 o que não favoreceu a formação de radicais hidroxila e, portanto, a oxidação do 17β-estradiol ocorreu principalmente pelo ozônio molecular.

Houve aumento do pH com o aumento da dose de ozônio aplicada (Figura 57A). O aumento foi maior a partir da dose de 12 mg L⁻¹, com máximo de 0,3 unidades de pH. O ozônio aumentou a condutividade da água, com maior amplitude entre o início e o final dos ensaios nas doses de ozônio aplicadas. Esta amplitude diminuiu, com o aumento da dose de ozônio aplicada, ocorrendo a inversão, ou seja, condutividade menor que a inicial quando se aplicou dose de 22,6 mg L⁻¹ (Figura 57B). A cor aparente e a turbidez aumentaram em doses de ozônio menores e diminuíram em doses maiores de ozônio possivelmente devido à floculação da matéria orgânica dissolvida em doses menores de ozônio levando ao aumento da cor aparente e da turbidez e a oxidação dessa matéria orgânica em doses maiores de ozônio levando à diminuição da cor aparente e da turbidez.

Houve tendência de aumento de alcalinidade total e alcalinidade parcial para doses de ozônio maiores que 0,95 mg L⁻¹ (Figura 57), coerente com o aumento de pH.

Figura 57 - Variação dos parâmetros - Δ = parâmetro no final do ensaio – Parâmetro no início do ensaio A: pH; B: Condutividade; C: Cor aparente; D: Turbidez; E: Alcalinidade total; F: alcalinidade parcial

* dados discretos

A remoção de 17β-estradiol em concentração inicial de 100 μg L⁻¹ estabilizou-se em 99,9% para dose de ozônio aplicada maior ou igual a 16,7 mg L⁻¹. Para esta eficiência a concentração residual de 17β-estradiol foi de 110 a 150 ng L⁻¹, valor ainda elevado (Tabela 54). Entretanto, a concentração de 17β-estradiol em água bruta afluenta a estações de tratamento de água para abastecimento é normalmente menor do que a usada nesse ensaio.

Para a concentração inicial de 1 μg L⁻¹ após a aplicação de ozônio em doses de 0,55 a 5,05 mg L⁻¹ não foi detectado 17β-estradiol (o limite de detecção do método é de 40 ng L⁻¹). Para a concentração inicial de 17β-estradiol de 500 ng L⁻¹ a remoção foi de aproximadamente 90% com residual de 50 ng L⁻¹, aplicando-se doses de aproximadamente 2 mg L⁻¹ (Tabela 54).

Empregando-se concentração de 17 β -estradiol de 100 ng L⁻¹, valor próximo ao normalmente encontrado em águas superficiais (BILA; DEZOTTI, 2007) e dose de 0,95 mg O₃ L⁻¹, próximo ao que se utiliza em tratamento de água para abastecimento (DI BERNARDO; DANTAS, 2005), a remoção foi de 73,7% e o residual de 17 β -estradiol foi de 40 ng L⁻¹, valor considerado não adequado (BILA; DEZOTTI, 2007).

Observa-se que a diminuição da concentração inicial de 17 β -estradiol resultou em diminuição da velocidade de remoção do mesmo. Westerhoff et al. (2005) obtiveram remoção de 17 β -estradiol de 98% com dose de ozônio variando de 2,5 a 4,0 mg L⁻¹ com concentração inicial de 17 β -estradiol de 250 a 100 ng L⁻¹, o que não ocorreu neste estudo nas doses aplicadas de ozônio (2,02 a 4,05 mg L⁻¹) chegando ao máximo de 91,2% na dose de 2,02 mg L⁻¹ com concentração inicial de 500 ng L⁻¹. Bila (2005), utilizando concentração inicial de 17 β -estradiol de 50 μ g L⁻¹, obteve remoções maiores a que as encontradas neste estudo como, por exemplo, para a dose de 5 mg L⁻¹ para a qual obteve residual de 17 β -estradiol de 10 ng L⁻¹, 1000 vezes menor do que o encontrado neste estudo na mesma dose aplicada (residual de 13 μ g L⁻¹). A diferença entre os resultados pode ser explicada pelas características das águas utilizadas que no presente estudo constituiu-se de água de poço à qual foi adicionada a cultura de *E.coli*, o que pode ter diminuído a eficiência de remoção do 17 β -estradiol e no estudo de Bila (2005) a matriz utilizada foi água ultrapura. Jasim et al. (2006), com dose de 1,25 mg L⁻¹, obtiveram para concentração inicial de 17 β -estradiol de 347 ng L⁻¹ remoção de 99%, com residual de 4 ng L⁻¹ o que está próximo ao encontrado neste estudo.

Paralelamente à análise do 17 β -estradiol a concentração de estrona foi monitorada, contudo não se observou nenhum indício de transformação de 17 β -estradiol em estrona, fato este observado em sistema com tratamento biológico (CHEN; HU, 2009a).

Os resultados referentes à concentração de 17 β -estradiol de 100 μ g L⁻¹ (Tabela 54) foram ajustados ao modelo de primeira ordem. Foram avaliadas duas alternativas sendo a primeira com todos os dados e a segunda excluindo-se a última dose de ozônio aplicada (22,6 mg L⁻¹). A primeira alternativa foi a que se ajustou melhor com um coeficiente de correlação R² de 0,99. Como pode ser observado na Figura 58 os dados experimentais se ajustaram muito bem aos dados calculados, com exceção dos dois primeiros pontos destacados em vermelho. A equação 6 foi a utilizada para o ajuste dos dados na Figura 58.

Tabela 54 - Remoção de 17 β -estradiol por oxidação

Concentração Inicial de 17 β -estradiol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ozônio aplicado (mg L^{-1})	Tempo de contato (min)	Residual 17 β -estradiol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Remoção %
0,1	0,95	1,0	0,007	93,0
0,5	2,06	5,0	0,056	88,9
0,5	2,02	5,0	0,044	91,2
1	0,55	5,0	<LD	<LD
1	0,54	5,0	< LD	<LD
1	5,05	5,0	<LD	<LD
100	0,23	5,0	55,6	44,5
100	0,29	5,0	38,7	53,9
100	0,62	1,0	58,7	50,9
100	0,77	1,0	62,1	46,0
100	4,05	5,0	13,1	88,6
100	12,2	15,0	0,36	99,6
100	16,7	30,0	0,11	99,9
100	22,6	30,0	0,15	99,9

Figura 58 - Remoção de 17 β -Estradiol por oxidação com ozônio

----- = Ajustados com todas as concentrações de ozônio ($R_2 = 0,9239$)

———— = Ajustados sem a concentração de ozônio de $22,6 \text{ mg L}^{-1}$ ($R_2 = 0,9932$)

$$C = C_0 e^{-KX} \quad (6)$$

Onde: C: Concentração de 17 β -estradiol, C_0 : Concentração inicial de 17 β -estradiol, X: dose de ozônio (mg L^{-1}), K: constante da reação $0,4081 \text{ L mg}^{-1}$

5.4.2 Oxidação do Estrona

A temperatura dos ensaios variou de 16 á 22 °C com média e mediana de 18 °C. A Tabela 55 apresenta as características da água antes da aplicação do ozônio com baixa cor, turbidez e condutividade e pH neutro.

Tabela 55 - Características da água antes da aplicação do ozônio

Variável	Média	Desvio Padrão
Condutividade (mS cm ⁻¹)	91	8
Cor (UC)	0,9	1,0
pH	7,0	0,2
Turbidez (UT)	0,34	0,15

A Figura 59 apresenta a variação das variáveis antes e após a aplicação do ozônio. Houve uma diferença no comportamento das variáveis com relação à concentração inicial de estrona, por isso essas variáveis foram avaliadas separadamente. A condutividade aumentou com o aumento da dose de ozônio aplicado, devido possivelmente à formação de subprodutos, ou à formação de algum subproduto específico. O mesmo comportamento não ocorreu com a concentração inicial de 100 µg L⁻¹ que teve um aumento na primeira dose aplicada para 70 mS cm⁻¹ na dosagem de 0,42 mg L⁻¹ de ozônio e nas demais doses não houve aumento entre a condutividade inicial e a final. O aumento mais pronunciado da condutividade também ocorreu na primeira dose aplicada para a concentração inicial baixa de estrona.

O pH também apresentou um comportamento distinto para as diferentes concentrações iniciais de estrona. Considerando a concentração inicial de estrona de 100 µg L⁻¹ esta apresentou uma variação no pH, comportamento este inversamente semelhante ao apresentado na Figura 63A do item 5.5, a qual reporta a formação dos subprodutos do estrona pela oxidação com ozônio. Pode-se verificar que o subproduto, ao qual o comportamento corresponde ao inverso observado para o pH, foi formado pela adição do radical hidroxila. Isto significa e explica que na faixa que em o subproduto do estrona se encontra em concentração elevada o pH está menor e quando o subproduto diminui o pH aumenta novamente, confirmando também a formação deste subproduto. Como se trata de uma concentração elevada de estrona (100 µg L⁻¹) foi suficiente para causar uma alteração no pH. Quando a concentração inicial de estrona é menor considerando os tratamentos com 100 ng L⁻¹, a alteração no pH também foi menor e em geral apresentou o mesmo comportamento (Figura 59). A variação da turbidez e da cor não apresentaram variações relevantes, com dois pontos anômalos, um em cada concentração inicial de estrona apresentada, sendo portanto descartados.

Figura 59 - Variação das variáveis com o aumento da dosagem de ozônio aplicada (Δ = variáveis no final do ensaio – variáveis no início do ensaio)

* dados discretos

A remoção de coliformes totais e *E. coli* também foram analisadas e encontram-se na Figura 60. Pode-se observar que a inativação de coliformes totais e *E. coli* foi maior que dois

log para dose de ozônio aplicada acima de 5 mg L^{-1} , em geral atingindo de 4 a 5 log de remoção. Abaixo da dose de $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ozônio a remoção foi menor que 2 log. A alta eficiência do ozônio foi confirmada na inativação destes microrganismos. Para remoção, oxidação do estrona (Tabela 56), exigiu-se uma dose de ozônio aplicada mais elevada, acima de $3,8 \text{ mg L}^{-1}$ para se obter 98,6% de remoção e ainda com residual de $1,4 \text{ ng L}^{-1}$ de estrona, que poderia causar efeito estrogênico a organismos aquáticos (JOBILING et al., 1998; ALDA; BARCELÓ, 2001).

Figura 60 - Inativação de *E.coli* e Coliformes totais por meio do ozônio

Tabela 56 - Porcentagem de remoção de estrona por oxidação com ozônio

Tempo de contato (min)	Concentração inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ozônio aplicado (mg L^{-1})	Concentração Final ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Remoção %
1	100	0,420	46,20	53,80
1	100	1,110	16,27	83,73
5	100	4,420	38,40	99,96
15	100	12,150	0,134	99,87
30	100	15,600	0,166	99,83
30	100	27,600	0,130	99,87
1	0,1	0,536	0,0015	85,30
1	0,1	0,812	0,0029	97,10
5	0,1	3,766	0,0014	98,62
15	0,1	10,091	ND	
30	0,1	13,491	ND	
30	0,1	23,461	ND	

Avaliou-se a cinética de remoção, no entanto a remoção é linear apenas até a dose de ozônio de $4,4 \text{ mg L}^{-1}$, como pode ser verificado na Figura 61.

Em concordância com o exposto na Tabela 56, Westerhoff et al. (2005) encontraram remoção de 99% para uma dose de ozônio de 2,5 a $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ e no presente estudo 99,9%. Broséus et al. (2009) verificaram remoção de 96% com dose de 2 mg L^{-1} , Hashimoto et al.

(2006) obtiveram 90% de remoção com dose de 1 mg L^{-1} e tempo de contato de 15 min (no entanto a matriz considerada foi efluente doméstico tratado biologicamente) e neste estudo foi de 83,7%. Deborde et al. (2005) chegaram a 95% de remoção com $0,002 \text{ mg min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ de ozônio.

Figura 61 - Remoção de estrona por oxidação com ozônio ($C_0 = 100 \mu\text{g L}^{-1}$)

5.4.3 Eficiência do ozônio na remoção dos hormônios - Comparação entre estrona e 17 β -estradiol

A Figura 62 mostra a remoção de E1 e E2 com diferentes dosagens de ozônio nos experimentos com concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e 100 ng L^{-1} . Como pode ser observado, ambos os estrógenos foram removidos eficientemente através da oxidação com ozônio. Para atingir 99% de remoção foi requerida dosagem de ozônio de $4,4 \text{ mg L}^{-1}$ para a estrona e para o 17 β -estradiol dosagem de 12 mg L^{-1} , considerando a concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. O mesmo comportamento foi observado para a concentração inicial baixa (100 ng L^{-1}), isto é, uma maior remoção do estrona comparada ao 17 β -estradiol. Esta constatação está em concordância com os resultados encontrados por Westerhoff et al. (2005) e por Hashimoto et al. (2006), porém em desacordo com o exposto por Lin et al. (2009), que verificaram uma maior velocidade de remoção para 17 β -estradiol ao invés do estrona, sendo esta diferença consideravelmente maior ocorrendo em todos os pHs analisados (pH de 3 a 9).

Deborde et al. (2005) reportaram duas velocidades de reação: uma em pH menor que 5 e a outra, em que a reação ocorre preferencialmente com o íon fenolato, em pH mais altos. Em pH menor a velocidade de reação é maior para o 17 β -estradiol do que para o estrona, invertendo com o aumento do pH, sendo que a velocidade de reação para pH mais altos é mais alta (ordem 10^9) em relação ao pH mais baixo (ordem de 10^4), o que explica a maior

velocidade de reação para o estrona encontrada neste estudo ($\text{pH} \sim 7,0$) e nos estudos de Westerhoff et al. (2005) ($\text{pH} 6,8$ a $8,2$) e Hashimoto et al. (2006), entretanto, contrariando o exposto por Lin et al. (2009). Contudo, vale ressaltar que várias variáveis poderiam interferir nesta cinética, tais como a presença de inibidores de radicais hidroxila, qualidade da água, concentração inicial (que no estudo de Lin et al. (2009) foi alta $C_0 = 10 \text{ mg L}^{-1}$), formação de subprodutos e até mesmo contaminação dos padrões.

Figura 62 - Oxidação de estrona e 17β-estradiol (concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e 100ng L^{-1}) com diferentes dosagens de ozônio.

* dados discretos

5.5 Ensaio de oxidação com ozônio: formação e identificação de subprodutos

Tão importante quanto remover o estrona e o 17β-estradiol foi verificar e identificar quais foram os subprodutos formados após a oxidação. Paralelamente à depleção dos estrogênios, outros novos picos apareceram no cromatograma obtido através do UPLC-QqTOF-MS das amostras ozonizadas. A razão massa/carga (m/z) e o tempo de retenção dos picos identificados na degradação de E1 e E2 estão demonstrados na Figura 63A e 63B respectivamente. Surpreendentemente, os principais subprodutos do E1 (com m/z de: 285, 275, 301 e 305) são similares aos encontrados para o E2 (com m/z de: 287, 277, 303 e 307) com a diferença de duas unidades de massa entre eles, que coincide com a diferença de duas unidades na massa molecular (MM) dos padrões estrona ($270,36608 \text{ g mol}^{-1}$) e 17β-estradiol ($272,38196 \text{ g mol}^{-1}$). Visto que esta diferença é devido à presença de um grupo cetona na posição 17 na estrutura molecular do E1, ao passo que, na mesma posição para o E2 há um

grupo hidroxila, o paralelismo observado entre os subprodutos do estrona e do 17 β -estradiol sugere que o ozônio ataca principalmente o anel aromático.

Em ambos os casos os subprodutos gerados mais persistentes e abundantes foram aqueles com m/z: 285 e 275 para E1 e 287 e 277 para o E2. Os outros subprodutos, com m/z 301 e 305 para E1 e 303 e 307 no caso do E2 foram formados em menor quantidade e, portanto não foram considerados nas discussões.

Figura 63 - Relação Massa/Carga (m/z) e tempo de retenção dos principais produtos com diferentes doses de ozônio identificados na degradação do estrona (E1) A e 17 β -estradiol (E2) B.

* dados discretos

Na Figure 63A observa-se que o subproduto com m/z 285 é estável até uma dosagem de ozônio de $12 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$, após esta dosagem de ozônio a concentração do subproduto diminuí, contudo não desaparece. O subproduto com m/z 275 e tempo de retenção 4,27 min aumentou até a dosagem de ozônio de $16,7 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ com sua concentração mantendo-se relativamente constante após está dosagem de ozônio. Na Figura 63B os subprodutos do E2 mostraram um comportamento semelhante aos dos subprodutos gerados do E1. A exceção foi que o subproduto com m/z 287 começou a diminuir com uma dosagem de ozônio menor, $4,0 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$, se comparado ao subproduto do E1 com m/z 285.

A composição elementar proposta pelo programa Masslynx para a massa exata medida pelo detector QqTOF-MS/MS, depois de aplicar as regras da química orgânica para eliminar formulas impossíveis e cenários de degradação possíveis para o composto alvo, foi $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_3$ para m/z 287 e $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_4$ para m/z 277. Portanto, considerando a estrutura do E2, levando em consideração que existem vários sítios onde o ozônio e/ou os radicais hidroxila podem atacar, e mesmo considerando que o ataque mais provável ocorra no anel aromático, existe mais de uma possibilidade de estrutura para o subproduto com m/z 287 ou, em outras palavras, com massa 288. As estruturas proposta que foram encontradas na literatura científica para os subprodutos da oxidação do estrona e do 17β -estradiol com massa molecular de 288 foram: 2-hidroxiestradiol (2OH-E2) identificado por Maniero et al. (2008) e Bila et al. (2007), monohidroxiados E2 (IRMAK et al. 2005), 10e-17b-dihidroxi-1,4-estradieno-3-one (DEO) (BILA et al., 2007) e testosterona (BILA et al. 2007, MANIERO et al., 2008) em experimentos realizados com ozônio. Os subprodutos 6-hidroxiestradiol (6OH-E2) (MAZELLIER et al. 2008, ZHAO et al., 2008), 2OH-E2 (MAI et al., 2008, MANIERO et al., 2008, ZHAO et al., 2008), testosterona (OHKO et al., 2002, ZHAO et al., 2008) e DEO (BILA et al., 2007, MAI et al., 2008, ZHAO et al., 2008) foram identificados em experimentos realizados com outros tipos de oxidantes como: foto-Fenton, fotólise ou TiO_2 fotocatalise. O subproduto com massa 278 (m/z 277) não foi encontrado na literatura consultada sendo, a primeira vez que o subproduto foi detectado.

Na tentativa de esclarecer a estrutura do subproduto com massa 288 alguns padrões foram adquiridos e analisados (2OH-E2, 4OH-E2 e 6OH-E2). No entanto, como pode ser observado na Figura 64 os tempos de retenção dos padrões 2OH-E2 (5,69 min) e 4OH-E2 (5,79 min) foram diferentes do tempo de retenção do subproduto do E2 com MM 288 (4,05 e 4,36 min) encontrado nos experimentos de ozonização ($16,7 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$). O oposto ocorreu com o padrão 6OH-E2 (3,99 min), para o qual o tempo de retenção foi similar. Contudo, quando o padrão foi fragmentado, o padrão de fragmentação foi totalmente diferente um do

outro (padrão 6OH-E2 e subproduto gerado através da ozonização do E2), indicando que o 6OH-E2 não foi o subproduto gerado na ozonização do E2. O padrão do estriol (E3), que também possui MM 288, foi analisado, mas os resultados também não coincidiram com os dados do subproduto encontrado na ozonização. Existe uma gama de compostos com possibilidade estrutural com MM 288, no entanto estas estruturas não possuem seu correspondente para a MM 286, quando o mesmo mecanismo de degradação é aplicado para o E1. Assim, o subproduto com MM 288 é esperado ser o composto chamado DEO que foi sugerido por Ohko et al. (2002) como subproduto gerado na degradação do 17β -estradiol pela fotocatalise com TiO_2 e confirmado por Mai et al. (2008) através da análise em LC-MS/MS. O composto testosterona foi descartado por possuir na sua fórmula estrutural dois oxigênios, ao invés de três, como sugerido pela massa exata dada pelo QqTOF-MS/MS.

Figura 64 - Íon monitorado (m/z 287). Cromatogramas obtidos no UPLC-QqTOF-MS/MS da análise do E2 tratado com 16,7 mg O₃ L⁻¹ e dos padrões 4OH-E2, 2OH-E2 e 6OH-E2 respectivamente.

A fragmentação dos subprodutos com m/z 287 e m/z 285 está demonstrada na Figura 65A e 65B respectivamente. A parte marcada no quadrado (linha pontilhada) é virtualmente idêntica, isto é apresenta os mesmos íons após a fragmentação em ambos os compostos, ao passo que a parte circulada (linha contínua) mostra um padrão de fragmentação com a diferença de duas unidades de massa. Baseado nestes espectros de massas e nos trabalhos anteriormente publicados (BILA et al., 2007, MAI et al., 2008, OHKO et al., 2002, ZHAO et al., 2008) acredita-se que o subproduto m/z 287 é o composto chamado DEO e o principal subproduto do E1 com m/z 285 acredita-se ser o composto correspondente ao m/z 287, no entanto com um grupo cetona ao invés de um grupo hidroxila na posição 17, isto é, o composto chamado 10-hidroxi-1,4-estradieno-3,17-dione (HEDO).

Figura 65 - Espectro de massas obtido no UPLC-QqTOF-MS/MS na análise de (A) experimento com E2 (íon pai 287) e (B) experimento com E (íon pai 285), e as correspondentes sugeridas estruturas. Voltagem do cono, 30 V; CE, 20 eV.

A rota de formação do composto DEO já tinha sido sugerida por Mai et al. (2008) e de acordo com esta, a formação do subproduto m/z 285 do E1 pode ser como sugerido na Figura 66. O subproduto com m/z 301, que foi mostrado na Figura 63A pode ser o subproduto com MM 302 mostrado na Figura 66, o que também confirma em parte que esta é uma das rotas de degradação do E1.

Figura 66 - Rota sugerida para a formação do subproduto com MM 286.

Para os subprodutos com m/z 277 e m/z 275 a rota de degradação foi baseada no mecanismo de ozonização do fenol (KOMISSAROV et al., 2006). A rota de formação está ilustrada na Figura 67 para o 17β -estradiol. A rota de degradação para o subproduto do E1 (m/z 275) é esperada ser similar à sugerida para o m/z 277, no entanto com um grupo cetona presente na posição 17. A Figura 68A e 68B mostra os íons no espectro de massa produzido na fragmentação dos subprodutos com m/z 277 e m/z 275 respectivamente, que dá suporte as estruturas propostas.

Figura 67 - Rota proposta para a formação dos subprodutos gerados na degradação do E2 com ozônio, MM 278.

Figura 68 - Espectro de massas e fragmentação proposta para o subproduto com m/z 277 (A) e m/z 275 (B) formado durante a ozonização do E2 e E1 respectivamente.

A ozonização foi realizada em águas com concentração inicial dos estrógenos baixa (100 ng L^{-1}). Estes experimentos foram realizados com duplo objetivo, o primeiro para confirmar os subprodutos previamente identificados em uma água com uma concentração inicial de hormônio baixa, o que é mais próximo da realidade encontrada no ambiente, e em segundo para determinar a dose de ozônio necessária para removê-los da água. Na Tabela 57 estão apresentadas as transições (primeira e segunda transição), voltagem do cono e energia de colisão otimizadas com as amostras de concentração inicial de $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para a identificação dos subprodutos do estrona e do 17β -estradiol previamente identificados.

Tabela 57 - Condições para a identificação dos subprodutos do estrona e 17 β -estradiol por UPLC-QqQ-MS/MS.

SRM	Voltagem do cono (VC)	Energia de Colisão (CE)
269 > 143	55	50
269 > 145	55	35
271 > 145	60	45
271 > 183	60	40
275 > 231	20	15
277 > 233	30	20
285 > 123	30	25
285 > 134	30	25
287 > 134	35	25
287 > 123	35	25

A Figura 69 mostra a evolução dos subprodutos previamente identificados durante os experimente de ozonização. Como pode ser observado, todos os subprodutos foram formados e chegaram à máxima concentração com uma dosagem de ozônio de aproximadamente 0,5 mg O₃ L⁻¹, diminuindo depois desta dosagem de ozônio. Comparativamente os subprodutos gerados pelo E2 persistiram até uma dose de 16 mg O₃ L⁻¹ e foram mais recalcitrantes do que os subprodutos gerados pelo E1 que desapareceram em uma menor dosagem de ozônio de 10 mg O₃ L⁻¹.

Os subprodutos do E2 e E1 com m/z 287 e m/z 285 respectivamente, tiveram o mesmo comportamento, sendo ambos completamente removidos após uma dosagem de ozônio de 4 mg O₃ L⁻¹ (Figura 69). O subproduto gerado pelo E1 com m/z 275 e o subproduto gerado pelo E2 com m/z 277 permaneceram na solução por mais tempo, até uma dosagem de ozônio de 10 e 16 mg O₃ L⁻¹, respectivamente.

Figura 69 - Cinética de formação e degradação dos principais subprodutos de degradação encontrados durante a ozonização do E2 (A) e E1 (B).

* dados discretos

Três dos principais subprodutos encontrados não haviam sido identificados antes e portanto, não existem dados a respeito da atividade estrogênica desses compostos. Huber et al. (2004) sugeriram que uma pequena modificação no anel aromático na estrutura molecular dos estrogênios reduz a estrogenicidade. Assim os subprodutos com m/z 287 e 285 podem ainda induzir a algum efeito estrogênico, enquanto que os subprodutos com m/z 277 e 275, devido à grande alteração na estrutura (principalmente a abertura do anel aromático), não é esperado serem estrogênicos. Todavia, o potencial estrogênico destes compostos deve ser avaliado, para se averiguar o risco potencial associado à exposição a estes compostos.

Muitos autores que investigaram a estrogenicidade de águas desinfetadas observaram uma atividade estrogênica após a ozonização das águas (ALUM et al., 2004, HUBER et al., 2004; KIM et al., 2004; MANIERO et al., 2008), indicando a ocorrência de subprodutos de degradação e que estes subprodutos são biologicamente ativos, mesmo após a aplicação de

altas doses de ozônio. Um aumento na concentração de ozônio de 0,5 para 10 mg L⁻¹ levou a uma redução das estrogenicidade em relação à água originalmente não tratada em um fator de 200 para 1000 vezes (HUBER et al., 2004).

Os subprodutos gerados pela ozonização dos estrógenos pode ser um risco não somente aos consumidores da água tratada, mas também aos organismos aquáticos que forem expostos a ela. Assim, quando o ozônio é utilizado na desinfecção de águas ou esgoto tratado, estes subprodutos podem ser formados e liberados no meio ambiente. Deste modo, para uma avaliação melhor dos riscos associados ao uso de uma água ozonizada, que contenha compostos estrogênicos, a estrogenicidade e a ecotoxicidade dos subprodutos devem ser avaliadas.

5.6 Tratamento com cloro: formação e identificação de subprodutos

Inicialmente os experimentos foram realizados com uma concentração inicial alta dos reagentes, 5 mg L⁻¹ de cloro e 10 mg L⁻¹ de estrona (tratamento A). Os subprodutos identificados estão apresentados na Figura 70.

Figura 70 - Subprodutos encontrados na oxidação de estrona (10 mg L⁻¹) com cloro (5 mg L⁻¹) (tratamento A) em função do tempo. Legenda (m/z e tempo de retenção).

* dados contínuos

O principal subproduto formado foi com m/z 353, sendo gerado após 5 min de reação, chegando à concentração máxima após 8 h de reação, persistindo mesmo após 24 h de tempo de contato com o cloro. O segundo subproduto mais abundante foi com m/z 275, no entanto este começou a ser identificado somente após 2 h de reação com cloro, sendo continuamente formado até 24 h.

A concentração de cloro total no tempo de contato de 8, 12 e 24 h de tratamento foi de 1,1; 0,2 e 0,1 mg L^{-1} respectivamente, demonstrando que havia cloro ainda na solução. Outros subprodutos minoritários foram formados e estão apresentados na Figura 71.

Figura 71 - Subprodutos minoritários formados através da oxidação do estrona (10 mg L^{-1}) pelo cloro (5 mg L^{-1}).

* dados contínuos

O composto com m/z 303 foi identificado por outros autores (NAKAMURA et al., 2006; NAKAMURA et al., 2007) como estrona monoclorada, sendo confirmado neste estudo ter um cloro na molécula pela abundância relativa isotópica. Este foi produzido em menor quantidade em relação aos explicitados anteriormente. Contudo permaneceu na solução mesmo após 24 h de reação com cloro. Por conseguinte, devida atenção deve ser dada a este composto, pois, de acordo com Nakamura et al. (2006), a atividade estrogênica que é capaz de causar 10% de resposta (EC_{10}) usando células de leveduras modificadas (Y190 com $hER\alpha$) para 4Cl-E1 foi levemente maior do que E1 (0,52 e 0,5 nM respectivamente) e para 2Cl-E1

0,74 nM. Contudo, a resposta estrogênica pode variar de acordo com o tipo de teste usado e diferentes receptores (NAKAMURA et al., 2006). Em um efluente clorado de uma estação de tratamento de esgoto, o 4Cl-E1 e 2Cl-E1 foram identificados em concentração de 14,5 ng L⁻¹ e 4,0 ng L⁻¹ (concentração inicial de E1 de 60 ng L⁻¹) (NAKAMURA et al., 2007).

O composto com m/z 349 foi identificado supostamente como estrona sulfato, devido ao fato de ter a perda de uma molécula de sulfato, apontado pela massa exata, e adicionalmente por não apresentar nenhum padrão de cloro na molécula. O composto com m/z 349 poderia ter sido formado através da reação do estrona e o tiosulfato de sódio, que foi adicionado após a coleta das amostras, não sendo, portanto um subproduto do cloro com a estrona e não se despendeu tempo na identificação deste composto.

Os compostos com m/z 319, 337 e 353 mostraram um padrão de abundância relativa isotópica com um, dois e dois átomos de cloro em cada composto, respectivamente. O composto com m/z 285 e 275 não mostrou nenhum padrão de abundância relativa de cloro na molécula, portanto não apresentando nenhum cloro nesses compostos. Assim sendo, para provar que estes compostos não foram produzidos por outra via, que não seja a cloração, isto é, contato com ar, contaminantes dissolvidos na água, atividade biológica e outras possíveis vias, realizou-se um experimento nas mesmas condições, contudo sem a adição de cloro. Após 21 h de reação não foram identificados subprodutos, sendo, portanto estes subprodutos (m/z 285 e 275) gerados pela reação com cloro, direta ou indiretamente.

O experimento de oxidação do cloro com 17β-estradiol (100 µg L⁻¹) foi realizado nas mesmas condições (tratamento B) e os mesmo subprodutos foram encontrados acrescidos de duas unidades com a mesma quantidade de cloro em cada composto (Figura 72), indicando que a reação ocorre na parte onde se encontra o grupo fenólico. Os subprodutos encontrados foram m/z 321, 287, 277, 339, 351, 355 e 389. Somente um novo composto foi identificado, se comparado com os outros encontrados para o estrona, com m/z 389, a abundância relativa isotópica mostra um padrão de cloro com três unidades na molécula. A massa exata obtida através do Q-ToF indica o composto com fórmula molecular de C₁₈H₂₁O₃Cl₃ com um erro de 1 ppm, que é pequeno. Adicionalmente, como forma de confirmar as posições do cloro e oxigênio na molécula, esta foi fragmentada com uma alta energia de colisão. Um dos fragmentos encontrado tinha massa 207,9297 e a massa exata foi de 207,9249 com um erro de 23,1 ppm, apesar de ser um erro alto, foi à única fórmula que o programa forneceu e adicionalmente o aumento do erro pode ser devido à alta energia de colisão aplicada para se chegar a este fragmento. A fórmula proposta pelo programa foi C₇H₃OCl₃, o que confirma a localização das moléculas de cloro e um oxigênio no anel aromático (Figura 73). Este

composto somente foi formado durante os primeiros minutos de reação, chegando ao seu máximo em 5 min de reação e após este tempo, decrescendo até os 30 minutos de reação (Figura 72).

O subproduto com m/z 339 seguiu o mesmo comportamento que o m/z 389, contudo este foi formado no primeiro minuto e após este tempo, provavelmente, se transforma em outro composto (Figura 72). A massa exata indica um composto com fórmula $C_{18}H_{22}O_2Cl_2$ para m/z 339, com um erro de 0 ppm. Em concordância com o exposto, a abundância isotópica relativa indica existir duas unidades de cloro na molécula, confirmando, em parte a fórmula molecular proposta para o composto com m/z 339. Como forma de confirmar o composto com m/z 339 e a rota proposta foi feita a fragmentação. Um dos fragmentos tinha massa 188,9514 e a massa exata dada 188,9519 com um erro de 2,1 ppm e fórmula proposta de $C_7H_3O_2Cl_2$, o que confirma os dois cloros e os dois oxigênios no anel aromático, por conseguinte confirmando o composto proposto (Figura 73).

Figura 72 - Subprodutos gerados através da oxidação do 17 β -estradiol (10 mg L⁻¹) pelo cloro (5 mg L⁻¹) (tratamento B). Legenda (m/z e tempo de retenção).

* dados contínuos

Na tentativa de elucidar a estrutura dos compostos que foram encontrados, eles foram fragmentados com uma energia de colisão elevada e uma rota foi proposta para a formação de

alguns deles. Esta rota de formação dos subprodutos do 17β -estradiol é a mesma para o estrona, pois somente foi possível propor estes compostos e esta via, devido ao fato de se eliminar algumas possibilidades de compostos que se encaixariam somente na degradação do estrona ou somente na degradação do 17β -estradiol. Portanto, a rota e os possíveis subprodutos teriam que ser passíveis de ocorrer em ambos os compostos (Figura 73). Todavia, estas estruturas devem ser isoladas e confirmadas através de outras técnicas analíticas, mas há fortes indícios de serem estes os subprodutos formados.

Figura 73 - Possível rota de formação dos subprodutos na degradação do 17β-estradiol pelo cloro.

Os tratamentos foram realizados novamente, mas com uma concentração inicial de estrona e 17 β -estradiol de 500 ng L⁻¹ e concentração de cloro de 1,5 mg L⁻¹, destacando-se que os ensaios de estrona e 17 β -estradiol foram realizados separadamente. Estes ensaios foram realizados com o intuito de se observar se os subprodutos formados teriam o mesmo comportamento com uma concentração inicial menor, sendo esta concentração mais próxima àquela que ocorre no meio ambiente, nas águas superficiais a concentração dos hormônios esta presente na ordem de ng L⁻¹. Para tal identificação foi necessário desenvolver um método para a análise destes compostos. Como não havia padrão disponível para uma validação completa, utilizaram-se os compostos previamente identificados em alta concentração inicial para uma validação parcial, isto é uma análise apenas qualitativa dos compostos e não quantitativa.

Os únicos compostos que foram passíveis de fazer a quantificação foram o estrona e o 17 β -estradiol, pois havia a disponibilidade de padrões. Devido a este fato, toda a discussão foi baseada na resposta do detector isto é, a área do pico cromatográfico. A Tabela 58 mostra os parâmetros utilizados para a identificação dos compostos e quando possível a transição de confirmação. No caso do composto com m/z 303, apesar de incessantes tentativas para se conseguir identificar sua transição de confirmação, esta não foi possível. Isso foi devido à baixa concentração deste subproduto no “padrão”, isto é, amostra com alta concentração de estrona, utilizada para validar estes dados. Contudo, mesmo assim, foi possível identificá-lo. A transição de identificação m/z 273/147 foi à utilizada para a identificação do padrão interno adicionado nas amostras.

Tabela 58 - SRM - condições utilizadas para a análise dos subprodutos gerados na reação do estrona (500 ng L⁻¹) com o cloro (1,5 mg L⁻¹).

Transição de identificação (TI)	Transição de Confirmação (TC)	Voltagem do cono (TI)	Voltagem do cono (TC)	Energia de colisão (TI)	Energia de colisão (TC)
275/135	275/231	25	25	25	15
275/247	275/231	25	25	15	15
285/123	285/134	20	20	25	25
349/225	349/239	40	40	45	40
349/321	349/157	35	35	25	40
269/145	269/143	45	45	35	55
319/155	319/121	25	25	25	25
353/189	353/317	40	40	25	20
303/303		45		10	
273/147		55		35	

A figura 74 mostra a formação dos subprodutos gerados a partir da degradação do

estrona. Como pode ser verificado alguns subprodutos foram identificados tais como: m/z (1º transição/ 2º transição) 319/155; 275/247; 275/135; 303/303; 353/189. A formação e degradação destes compostos mostraram-se bastante lenta, possivelmente devido à reatividade do cloro com o grupo álcool, que são reações muito lentas (DEBORDE E VON GUNTEN, 2008).

O principal subproduto formado, que persistiu, mesmo após 16 dias de tempo de contato foi o m/z 275, seguido pelo m/z 353. O m/z 303 diminuiu gradativamente até as primeiras 12 horas de tratamento com cloro, não permanecendo na solução após este tempo. Ambos os compostos (m/z 353 e m/z 303) foram formados nos primeiros 5 minutos de tratamento.

Figura 74 - Subprodutos gerados pela oxidação de estrona (500 ng L^{-1}) com cloro ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) após 16 dias de tempo de contato (tratamento C). Legenda: m/z (primeira transição/ segunda transição).

* dados contínuos

Observa-se em detalhes, na Figura 75, a formação dos subprodutos, na qual foi excluído o tempo zero, ou seja, a área referente à concentração inicial de estrona para melhor analisá-lo. O composto com m/z 353 se manteve praticamente inalterado até 12 horas de

tempo de contato e após este tempo diminuiu lentamente, mas não desaparecendo até 16 d de tratamento. O composto com m/z 319, o terceiro subproduto com maior área, formou-se nos primeiros 5 minutos e não se alterou até 2 horas de tempo de contato, diminuindo 40% nas duas horas seguintes e permanecendo praticamente inalterado até o décimo sexto dia.

Outro fato importante a se considerar, são dois pontos anômalos, em 12 h e 4 dias de tempo de contato para o estrona, cujas concentrações não seguiram a tendência de variação e algum problema pode ter ocorrido nestes dois pontos, contudo devido ao grande número de coletas, estes não influenciaram na análise do experimento.

A concentração de estrona, mesmo após 16 dias de tratamento com cloro, foi de 6 ng L⁻¹, isto é 98,8% de remoção.

Figura 75 - Subprodutos gerados através da oxidação de estrona (500 ng L⁻¹) pelo cloro (1,5 mg L⁻¹) após 5 minutos a 16 dias de tempo de contato (tratamento C).

* dados contínuos

O composto m/z 353 representou aproximadamente 22% de conversão de estrona em m/z 353, considerando os primeiros 5 e 30 minutos de reação. Para o composto 303 a taxa de conversão foi de aproximadamente 17% considerando também 5 e 30 minutos de tempo de contato. Isto é, 40% do estrona foi inicialmente transformado nestes dois compostos. O composto com m/z 319 teve uma taxa de conversão de 7,7% aos 30 min. Considerando o tempo de 30 minutos de reação 52% do estrona degradado foi identificado na formação de

outros compostos. Recomenda-se que os outros 48% do estrona degradado não identificado devam ser analisados por outras técnicas, colunas e condições distintas das utilizadas, ressaltando-se que um dos compostos não pôde ser avaliado neste experimento, pois foi descoberto posteriormente a análise das amostras, isto é, com m/z 337. Ressalva-se também que esta é uma estimativa e para se avaliar melhor as porcentagens de conversão se deveria preparar ou adquirir padrões para se confirmar as porcentagens de conversão.

Na Figura 76 está demonstrada a oxidação de 17 β -estradiol pelo cloro. Vale ressaltar que a ordem de grandeza das áreas expostas na Figura 76 são diferentes daquelas da Figura 75, devido à diferença na técnica utilizada para detecção dos subprodutos. A Tabela 59 mostra as transições utilizadas para a detecção dos subprodutos. A transição 276/147 foi usada para identificar o padrão interno utilizado.

Tabela 59 - SRM - condições utilizadas para a análise dos subprodutos gerados na reação do 17 β -estradiol (500 ng L⁻¹) com o cloro (1,5 mg L⁻¹).

Transição de Identificação (TI)	Transição de Confirmação (TC)	Voltagem do cono (TI)	Voltagem do Cono (TC)	Energia de Colisão (TI)	Energia de Colisão (TC)
277/233	277/231	35	15	35	25
277/233	277/249	30	20	30	15
287/134	287/123	35	25	35	25
321/155	321/285	45	20	50	15
271/145	271/183	60	45	60	40
305/269	305/305	55	30	55	5
339/213	339/307	40	45	40	40
355/189	355/319	55	25	55	15
389/353	389/208	50	20	50	40
276/147		60	35		

Como pode ser verificado na Figura 76 nos primeiros 10 minutos os principais produtos formados foram: m/z 355/189; 277/233 (Tr 12,07); 277/233 (Tr 12,58); 321/155; 305/269; 287/134; 339/213; 389/353. Esta ordem se manteve praticamente inalterada (ao menos para os subprodutos com maior produção) até 60 min de tempo de contato. Após este tempo houve inversão; 277/233 (Tr 12,8); 277/233 (Tr 12,07); 355/189; 321/155. Os outros subprodutos, com menor produção, apresentaram variação maior ao longo do tempo.

Figura 76 - Subprodutos gerados através da oxidação de 17β -estradiol (500 ng L^{-1}) pelo cloro ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) após 16 dias de tempo de contato (tratamento D).

* dados contínuos

No tempo de contato de 16 dias há um aumento considerável na concentração de 17β -estradiol o que já foi comentado no item de oxidação do 17β -estradiol pelo cloro, item 5.3.2. Em geral a formação e degradação dos subprodutos se manteve, com a persistência dos 4 principais subprodutos (277/233 (Tr 12,8); 277/233 (Tr 12,07); 355/189; 321/155) presentes até o final do experimento e em todas as amostras analisadas, confirmando que o composto inicial foi degradado. No entanto, alguns dos seus subprodutos permaneceram, cabendo analisar se estes subprodutos gerados são estrogênicos e/ou tóxicos. Alum et al. (2004), estudando a estrogenicidade do 17β -estradiol encontraram que após 4 dias de tempo de contato com o cloro ($0,05$ a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) ainda havia potencial estrogênico nas amostras, possivelmente dos subprodutos formados durante a cloração, utilizando linhagem de células humanas de câncer de mama (MCF-7). Em experimento com 24 horas de tratamento com 1 mg L^{-1} de cloro, a remoção da estrogenicidade ocorreu na primeira uma hora, permanecendo até o final do tratamento.

Novamente 50% dos compostos foram detectados, sendo a análise realizada apenas

considerando o tempo de 10 minutos, com as seguintes porcentagens: 16% (355/189); 8,4% (277/233-Tr 12,07); 7,3% (277/233-Tr 12,58); 5,5% (321/155), totalizando 37%. Ressalva-se também que esta é uma estimativa e para se avaliar melhor se deveria preparar ou adquirir padrões para se confirmar o exposto acima.

Em geral a formação dos subprodutos com concentração inicial elevada de estrógenos (10 mg L⁻¹) e concentração inicial baixa de estrógenos (500 ng L⁻¹) seguiram a mesma tendência, isto é, os mesmo subprodutos foram formados (considerando até o tempo de 24 h, tempo máximo da análise realizada com concentração inicial elevada). Para tempos de contato maiores os subprodutos majoritários mudaram devido à contínua degradação dos compostos.

No entanto, deve-se ressaltar que a cinética de formação e degradação dos compostos formados para o estrona e 17 β -estradiol foram distintas, considerando a degradação após 16 dias, apesar dos compostos formados serem parecidos estruturalmente.

5.7 Análise de água potável

5.7.1 Primeiro grupo de amostras (Tratamento E)

No primeiro grupo de coletas (tratamento E), apenas os subprodutos do estrona e o estrona foram analisados. Treze amostras foram analisadas no total, coletadas em diferentes pontos da cidade de Barcelona e redondezas, como descrito no material e métodos (Item 4.2.2.8). Nenhum subproduto do estrona foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. O estrona foi detectado na mesma amostra em épocas distintas e também na repetição que foi realizada na amostra de 19/3/2010 (Tabela 60). A média das concentrações foram 6,7 e 6,0 ng L⁻¹ para as amostras de março e maio, respectivamente, consideradas concentrações elevadas para amostras de água potável. No entanto, alguns cuidados são feitos para se garantir que o resultado seja tomado como verdadeiro. Entre eles o uso de amostras que não contenham o composto de interesse, chamadas neste estudo de amostras em branco, isto é são amostras de água HPLC. Estas amostras são usadas durante a extração para verificar a eficiência da mesma e possíveis contaminações durante todo o processo, até a quantificação. Deste modo, as amostras em branco utilizadas durante este lote de amostras deram negativo, isto é sem estrona na amostra branca e dos subprodutos do estrona.

Outros fatores confirmam a concentração encontrada nas amostras, o fato de se trabalhar com padrão interno, a repetição ter confirmado a concentração encontrada e adicionalmente as amostras terem sido confirmadas pelo tempo de retenção e pela relação

entre a primeira e segunda transição, portanto podemos considerar a concentração encontrada nas amostras como verdadeira. Como em nenhum outro ponto da cidade encontrou-se tal concentração a causa pode ser devido a esta água ser proveniente de uma fonte diferente das demais (captação), a segunda opção seria contaminação pontual, isto é, tubulações ou infiltração na rede e possível contaminação desta localidade. As amostras estão também dentro do LOQ e LOD tanto para os valores obtidos pelas amostras, quanto os adquiridos através da curva de calibração (média dos pontos da curva de calibração).

Tabela 60 - Resultado das amostras para o estrona na primeira coleta

Número Amostra	Data	Rep.	C *	C	Confirmação 2º Transição	Amostras ng L ⁻¹		C. C. ng L ⁻¹	
			ng L ⁻¹	Média ng L ⁻¹		LOD	LOQ	LOD	LOQ
6	19/3/2010	1	5,0	6,7	positivo	1,1	2,7		
6	19/3/2010	2	8,4		positivo	1,0	2,5		
6	4/5/2010	1	7,5	6,0	positivo	2,5	6,6	0,8	2,1
6	4/5/2010	1	4,6		positivo	1,1	2,9		
8	7/5/2010	1	1,9		negativo	1,1	2,9		

* Já considerando a % de recuperação

Rep. = Repetição, C = Concentração, C.C. = Curva de Calibração

As amostras em branco deram negativo para o estrona e seus subprodutos. A recuperação do estrona foi de 116% com um DP de 18,1%. As amostras dopadas na concentração de 2 ng L⁻¹ e 5 ng L⁻¹ foram analisadas e a recuperação encontrada foi de 85% e 92%. Como estas amostras foram extraídas apenas uma vez, preferiu-se calcular a recuperação baseada na concentração alta de 500 ng L⁻¹ (que foi extraída 4 vezes). A Tabela 61 demonstra os pontos utilizados para a construção da curva de calibração e a exatidão da mesma.

Tabela 61 - Curva de calibração e exatidão para o estrona na primeira coleta

Curva de calibração	Valor encontrado	Exatidão
µg L ⁻¹	µg L ⁻¹	%
1	1,0	-0,8
2,5	2,2	-13,8
5	5,5	9,7
10	10,2	1,9
50	48,1	-3,9
100	100,9	0,9

Para este grupo de amostras foram injetados 18 CQs dos quais 11 deles estavam dentro do esperado, isto é com uma exatidão aceitável de $\pm 10\%$ (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002). A directiva de 657/EC (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002) é bastante restritiva em

alguns aspectos e se torna difícil realizar todas as etapas, por ela recomendada, em um estudo isolado de compostos, isto é, não são para análises de rotina de um laboratório.

Também seguindo as recomendações da directiva de 657/EC (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002), esta recomenda que para que uma amostra positiva seja aceitável deve-se ter uma variação máxima no tempo de retenção de 2,5%. Todas as amostras positivas analisadas estavam dentro da variação permitida. Outro ponto muito importante, sendo este decisivo para a eliminação de uma amostra positiva, é estar dentro da tolerância máxima permitida da intensidade relativa dos íons. Isto é, a relação entre a primeira transição e a segunda transição (transição de confirmação). Caso a relação encontrada para uma dada amostra não seja a mesma encontrada para os padrões, a amostra é descartada, conforme mostra a Tabela 62

Tabela 62 - Condições para aceitação/rejeição de uma amostra em LC/MS/MS

Intensidade relativa % do pico base	LC/MS/MS
> 50%	± 20 %
> 20% - 50%	± 25 %
>10 % - 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

Fonte – (657/EC/2002)

Para o estrona a porcentagem do pico base estava em 44% (a porcentagem da segunda transição em relação à primeira), permitindo uma porcentagem de variação máxima de $\pm 25\%$ (Tabela 62) entre o valor tido como referência (relação da primeira e segunda transição obtida com os padrões) e o valor obtido na relação entre as transições para a amostra. Como mostrado na Tabela 60 todas as amostras analisadas estavam dentro do limite permitido para este requisito, com exceção da amostra número 8, que foi descartada. Esta se encontra em destaque (vermelho) na Tabela 60.

5.7.2 Segundo grupo de amostras (Tratamento F)

No segundo grupo de amostras, novamente nenhum subproduto foi identificado, contudo uma amostra foi positiva para o composto estrona (Tabela 63), estando dentro do limite de detecção e quantificação, confirmada pela relação entre a primeira e segunda transição e tempo de retenção. A Figura 77 mostra o cromatograma da amostra número 16, onde se tem o pico referente ao estrona - primeira transição (269>145)- e o padrão interno –

identificado como 273>147.

Tabela 63 - Análise do segundo grupo de amostras

Número Amostra	Concentração ng L ⁻¹	Confirmação 2º Transição	Amostras ng L ⁻¹	
			LD	LQ
16	0,5	positiva	0,01	0,1

Figura 77 - Cromatograma da amostra número 16 do composto estrona e o padrão interno.

A Figura 78 mostra a curva de calibração utilizada para o cálculo da amostra 16, com o R^2 acima de 0,9999. A Tabela 64 e 65 mostram a porcentagem de recuperação do composto estrona e 17 β -estradiol e dos seus subprodutos. No apêndice - Tabela 11 pode-se observar os cromatogramas contendo os picos e tempos de retenção de todos os compostos analisados.

Na Tabela 64 observar-se que a porcentagem de recuperação diminuía de acordo com a diminuição da concentração. Os pontos em vermelho foram descartados para o cálculo da recuperação, pois eram valores extremamente elevados. Parte do ocorrido foi devido à inexperiência em se trabalhar em concentrações muito baixas, na ordem de 0,01 ng L⁻¹ e de se trabalhar com a extração on-line. Somente após a terceira tentativa conseguiu-se melhorar a linearidade e a porcentagem de recuperação das amostras.

Para os subprodutos do estrona e do 17 β -estradiol a recuperação em média foi satisfatória para os compostos com m/z 353, 389, 337, 319, 355, 305, 339, 275 e 321 que variou de 80 a 130%. Dois compostos estavam com porcentagens de recuperação de 280% e 157%, muito aquém de representar a realidade, sendo os compostos 285/134 e 287/134. Três compostos com uma porcentagem de recuperação baixa, isto é 28%, 40% e 74% para os compostos com m/z 277*, 277** e 275*, respectivamente. Como foi extraída uma quantidade

de amostra elevada para a extração on-line, e de acordo com Rodriguez-Mozaz et al. (2004b), quanto maior o volume extraído (250 mL) maior a possibilidade de compostos mais polares, como estriol, diminuïrem a porcentagem de recuperação devido à perda durante a extração. Deste modo, o mesmo pode ter ocorrido para este grupo de compostos que obtiveram baixa recuperação de extração, sendo indicado ou volume menor de extração, modificação do meio adsorvente ou das condições da extração.

Compound name: 269>145 19.3
 Correlation coefficient: $r = 0.999985$, $r^2 = 0.999970$
 Calibration curve: $0.983659 * x + -0.0713427$
 Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

Figura 78 - Curva de calibração do estrona calculada pelo programa TargetLynx.

Tabela 64 - Recuperação do E1 e E2 segundo grupo de amostras

Composto	Recuperação %		
	100 ng L ⁻¹	10 ng L ⁻¹	0,1 ng L ⁻¹
E1	94,8	96,1	72,5
	113,3	112,2	540,4
	116,7	226,4	476,8
Média %	108,3	104,2	72,5
E2	87,3	94,2	20,2
	104,6	98,9	55,4
	109,3	199,8	90,0
Média %	100,4	96,6	72,7

Tabela 65 - Porcentagem de recuperação da metodologia dos subprodutos do E1 e E2 no segundo grupo de amostras

	% recuperação						
subprodutos E1	353/189	389/353	337/123	319/155	285/134	275/231**	275/231*
rep 1	147,3	81,1	138,1	99,8	357,9	132,6	111,9
rep 2	100,6	101,7	101,7	90,8	203,2	46,1	35,2
Média	123,9	91,4	119,9	95,3	280,5	89,4	73,5
subprodutos E2	355/189	305/269	339/213	321/155	287/134	277/233**	277/233*
rep 1	102,9	153,7	116,4	72,6	196,7	63,4	42,6
rep 2	93,4	105,7	87,9	91,5	116,2	16,3	12,6
Média	98,2	129,7	102,2	82,0	156,5	39,9	27,6

** segundo tempo de retenção

*primeiro tempo de retenção

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na pesquisa conclui-se que as condições do detector de fluorescência para o 17 β -estradiol foram: excitação em 230 nm e emissão em 306 nm e para o estrona foram: excitação em 230 nm e emissão em 310 nm. O procedimento analítico implementado demonstrou confiabilidade com limites de detecção e quantificação de 40 ng L⁻¹ e 50 ng L⁻¹ para o 17 β -estradiol e 1,0 e 1,5 μ g L⁻¹ para o estrona.

A inativação de *E. coli* e coliformes totais proporcionada pelo cloro, nas dosagens e tempos de contato utilizados, atendeu ao padrão da Portaria MS 518/05 e ao mesmo tempo houve remoção de 17 β -estradiol e estrona, indicando que o processo oxidativo contribuirá para a remoção de hormônios em águas de abastecimento. Também constatou-se que a presença de *E.coli* não afetou a remoção de 17 β -estradiol nas concentrações estudadas.

Verificou-se que uso do CT, no caso, dos compostos 17 β -estradiol e estrona, não se mostrou adequado para o tratamento dos dados e que a concentração inicial de hormônio afetou a eficiência de remoção dos mesmos. Quanto menor a concentração inicial de hormônio, menor foi a remoção. No entanto, este efeito tende a diminuir com o aumento da dosagem de cloro aplicada.

A oxidação da água contendo 17 β -estradiol e estrona por cloro, nas doses e tempos de contato utilizados na pesquisa – 0,5; 1,0; 2,0; e 5,0 mg Cl₂ L⁻¹; 10, 20 e 30 min – foi eficiente para remover os compostos em questão, porém com concentração final que permaneceu acima dos limites de quantificação destes hormônios, indicando que a remoção não foi completa. Mesmo em condições favoráveis, isto é matriz limpa, ainda se encontrava 17 β -estradiol e estrona na água com concentrações de 1,8 ng L⁻¹ e 12,5 ng L⁻¹ respectivamente, após oxidação com 1,5 mg L⁻¹ de cloro, 24 h de tempo de contato e C₀ = 500 ng L⁻¹. Este fato confirma que os compostos em questão são de difícil degradação e que possuem uma remoção lenta, sendo difícil alcançar sua completa eliminação a níveis que não causem efeito deletério a organismos aquáticos.

No teste de toxicidade crônico após sete dias de exposição a 50 μ g L⁻¹ de 17 β -estradiol verificou-se a morte de peixes da espécie *Danio rerio*. A mortalidade de 50% dos peixes ocorreu após o décimo sétimo dia de exposição e no vigésimo primeiro dia (final do experimento) 78% dos peixes haviam morrido. Confirmando que o composto 17 β -estradiol afeta o organismo dos peixes da espécie *Danio rerio* e que a exposição prolongada e

concentração elevada pode levar a morte desses peixes. Constatou-se também que após 21 dias de exposição á uma água contendo 17β -estradiol após á cloração os peixes machos ainda apresentaram uma alteração na concentração da proteína VTG indicando que a água possuía compostos com efeito estrogênico. No tratamento com concentração inicial de 100 ng L^{-1} de 17β -estradiol após a cloração verificou-se uma diminuição do efeito estrogênico em relação à amostra não tratada, no entanto esta redução não foi suficiente para não causar efeito estrogênico nos peixes machos. Considerando as fêmeas verificou-se que a cloração do 17β -estradiol nas condições estudadas, afetou negativamente á produção da proteína VTG em relação ao grupo controle em um dos grupos analisados.

Utilizando o ozônio como desinfetante, com uma dosagem acima de $1,1 \text{ mg L}^{-1}$, este apresentou uma taxa de inativação dos organismos indicadores maior que 2 log, confirmando a eficiência deste oxidante na eliminação de tais microrganismos. Já considerando o ozônio como oxidante dos compostos 17β -estradiol e estrona foi necessário dosagens elevadas de ozônio para que estes compostos não fossem mais detectados. A completa eliminação ($< \text{LD}$) do estrona ocorreu com uma dose de ozônio de 10 mg L^{-1} , sendo que com a dosagem anteriormente aplicada de ozônio, $3,8 \text{ mg L}^{-1}$, a concentração de E1 quantificada foi de $1,4 \text{ ng L}^{-1}$. Para a completa eliminação ($< \text{LD}$) do 17β -estradiol a dose necessária de ozônio foi de $4,2 \text{ mg L}^{-1}$, sendo que com a dosagem anteriormente aplicada de ozônio de $0,95 \text{ mg L}^{-1}$ a concentração de E2 quantificada foi de $7,0 \text{ ng L}^{-1}$.

Ao se comparar a eficiência de remoção entre o 17β -estradiol e o estrona verificou-se que nas condições estudadas o 17β -estradiol apresentou uma maior remoção do que o estrona quando o cloro foi utilizado como oxidante. No entanto, quando o ozônio foi considerado como oxidante, obteve-se uma maior remoção do estrona do que do 17β -estradiol.

Embora o E2 e o E1 terem sido eficientemente removidos da água através da ozonização, cada um deles gerou dois principais subprodutos durante a ozonização. Estes subprodutos foram MM 288 e 278 para o 17β -estradiol e MM 286 e 276 para o estrona. O composto com MM 288 já havia sido previamente identificado, tendo indícios que seja o composto chamado DEO. No entanto, os outros três subprodutos foram identificados pela primeira vez. Portanto, baseado que os subprodutos encontrados diferiam entre si em duas unidades de massa, como a diferença entre os padrões E2 e E1, concluiu-se que os compostos E2 e E1 seguem a mesma rota de degradação.

A eliminação total dos subprodutos do E1 e do E2 somente ocorreu quando altas doses de ozônio foram aplicadas, $10 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ e $16 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ para os subprodutos gerados pelo E1

e pelo E2 respectivamente.

A oxidação de estrona e 17 β -estradiol pelo cloro levou a formação de vários subprodutos, alguns clorados e outros não. Os subprodutos do 17 β -estradiol foram principalmente: m/z 319, m/z 275 (247), m/z 275 (135); m/z 303 e m/z 353. Para o estrona foram: m/z 355, m/z 277 (Tr 12,07), m/z 277 (Tr 12,58), m/z 321, m/z 305, m/z 287, m/z 339 e m/z 389.

Os subprodutos da cloração do estrona e do 17 β -estradiol foram identificados novamente utilizando uma concentração inicial de 500 ng L⁻¹, 1,5 mg L⁻¹ de cloro durante 16 dias de tempo de contato, confirmando os subprodutos anteriormente detectados. Mesmo após 16 dias de tempo de contato com cloro alguns subprodutos persistiram na solução sendo eles para 17 β -estradiol: m/z 355, m/z 277 (Tr 12,07), m/z 277 (Tr 12,58), m/z 321 e m/z 287 e para o estrona: m/z 319, m/z 275, m/z 275 e m/z 353. Sendo, portanto persistentes, nas condições estudadas.

Nas duas amostragens realizadas da água potável na região de Barcelona, não foi detectado nenhum subproduto do estrona nem do 17 β -estradiol nas águas analisadas. Todavia, detectou-se estrona em duas amostras de água potável, em localidades e coletas distintas, na concentração de 6,0 ng L⁻¹ e 0,5 ng L⁻¹.

7 RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se o uso detectores mais seletivos e sensíveis, tais como espectrômetro de massas para a quantificação de 17 β -estradiol e estrona em amostras ambientais, com o objetivo de se quantificar e detectar concentrações ao nível de ng L⁻¹.

Para uma melhor avaliação na variação dos parâmetros durante um ensaio, recomenda-se sempre fazer um ensaio em branco, neste estudo recomendaria-se a repetição de alguns ensaios sem o uso da cepa de *E.coli*, o qual pode ter interferido na concentração de COT.

De acordo com os resultados apresentados nesta tese, considerando que o estrona e o 17 β -estradiol são continuamente liberados no ambiente e devido ao alto poder impactante que os disruptores endócrinos possuem, recomenda-se maiores estudos sobre os mesmos. Assim como, uma avaliação da dinâmica deste no ambiente e dos seus subprodutos e das concentrações a partir das quais estes compostos possam causar efeitos deletérios a fauna brasileira e ao ser humano. Para que a partir de tais pesquisas se possa propor uma norma para este tipo de composto. Salienta-se que não há qualquer tipo de norma que regule este tipo de composto e muito menos a de seus subprodutos no meio ambiente.

Recomenda-se uma avaliação dos riscos associados ao uso de uma água ozonizada, assim como de uma água clorada que contenham compostos estrogênicos, avaliando a estrogenicidade e a ecotoxicidade dos subprodutos formados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Maio, 2003.
- ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by chromatography – diode array detection – mass spectrometry. **Journal of chromatography A**. v. 892, p. 391-406, 2000.
- ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, 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 of chromatography A**. v. 911, p. 818-824, 2001.
- ALUM, A.; YOON, Y.; WESTERHOFF, P.; ABBASZADEGAN, M. Oxidation of Bisphenol A, 17 β - Estradiol, and 17 α - Ethynyl Estradiol and Byproduct Estrogenicity. **Environmental Toxicology**, v.19, p. 818-824, 2004.
- APHA-AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION /AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION(AWWA)/WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005)**. 21st ed., Washington DC, USA.2005.
- ARAÚJO, J. C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara – SP na remoção de hormônios sexuais**. 2006. 83 f. Dissertação de Mestrado em química analítica- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- ASCENZO, G.D.; CORCIA, A.DI.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199–209, 2003.
- BASTOS, R.K.X., BEVILACQUA, P. D., HELLER, L. VIEIRA, M. B. C. M., BRITO, L. L. A. Abordagem sanitário-epidemiológica do tratamento e da qualidade parasitológica da água: entre o desejável e o possível. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001, João Pessoa. 2001. **CD-ROM**. João Pessoa, 2001, p. 1-12.

- BEDDING, N.D.; MCINTYRE, A.E.; PERRY, R.; LESTER, J.N. Organic contaminants in the aquatic environment II. Behaviour and fate in the hydrological cycle. **Science Total Environ.**, v. 26, p. 255, 1983.
- BENOTTI, M.J.; TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B.J.; HOLADY, J.C.; STANFORD, B.D.; SNYDER, S. A. Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. **Environ. Sci. Technol.**, v.43, p. 597- 603, 2009.
- BICCHI, C.; SCHILIRÒ, T.; PIGNATA, C. ; FEA, E.; CORDERO, C.; CANALE, F.; GILLI, G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. **Science of the total environment**. V. 407, p. 1842-1851, 2009.
- BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -Estradiol pelo processo de ozonização**. 2005, 281 f. Tese (Doutorado) na Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- BILA, D. M.; MONTALVÃO, A. F.; AZEVEDO, D. A.; DEZOTTI, M. Estrogenic Activity Removal of 17 β -Estradiol by Ozonation and Identification of byProducts. **Chemosphere**, v. 69, p.736-746, 2007.
- BIRKETT, J. W.; LESTER, J.N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**. 2002. 295 p.
- BOWMAN, J. C.; READMAN, J. W.; ZHOU, J. L. Sorption of the Natural Endocrine Disruptors, Oestrone and 17 β -Oestradiol in the Aquatic Environment. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 25, n. 1, p. 63-67, 2003.
- BRASIL. Ministério sa saúde. **Portaria 518 de 25 de março de 2004**. 16 p., 2004.
- BRION, F.; TYLER, C.R.; PALAZZI, X.; LAILLET, B.; PORCHER, J.M.; GARRIC, J.; FLAMMARION, P. Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (Danio rerio). **Aquatic Toxicology**. v. 68, p. 193–217. 2004
- BROSÉUS, R.; VINCENT, S.; ABOULFADL, K.; DANESHVAR, A.; SAUVÉ, S.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticide during drinking water treatment. **Water research**, v. 43, p.

4707-4717, 2009.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. Jr.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.

CARBALLA, M.; OMILA, F.; LEMA, J. M.; LLOMPART, M.; GARCÍA-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GOMEZ, M.; TERNES, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, p. 2918–2926, 2004.

CHEN, P.; LINDEN, K. G.; HINTON, D. E.; KASHIWADA S.; ROSENFELDT, 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, C-Y.; WEN, T-Y.; WANG, G-S.; CHENG, H-W.; LIN, Y-H.; LIEN, G-W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using highflow solid-phase extraction and liquid chromatography. **Sci Total Environ**. v. 378, p. 352-365, 2007.

CHEN, X; HU, J. Degradation of 17 β -estradiol and its conjugates: Effects of initial concentration and MLSS concentration. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1330-1334, 2009a.

CHEN, H.-C.; KUO, H.-W.; DING, W.-H. Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. **Chemosphere**, v. 74, p. 508-514. 2009b.

COMPANHIA ESTADUAL DE SANEAMENTO BÁSICO E DE CONTROLE DA POLUIÇÃO DAS ÁGUAS (CETESB)- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. 1ª ed. São Paulo, 1987. 150 p.

COMUNIDADE EUROPÉIA. DIRECTIVE 2002/657/EC. In **Official Journal of European Community**. 2002.

DANIEL, L.A. (Coord.). **Processos de Desinfecção e Desinfetantes Alternativos na Produção de Água Potável**. PROSAB. 1. ed. São Carlos. 2001, 139 p.

DEBORDE, M.; RABOUAN, S.; DUGUET, J.P.; LEGUBE, B. Kinetics of aqueous ozone-

induced oxidation of some endocrine disrupters. **Environ. Sci. Technol.** v. 39, p. 6086-6092, 2005.

DEBORDE, M.; RABOUAN, S.; GALLARD, H.; LEGUBE, B. Aqueous Chlorination Kinetics of Some endocrine disruptors. **Environ. Sci. Technol.** v. 38, p. 5577- 5583, 2004.

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.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e Técnicas de tratamento de água.** 2nd ed. São Carlos- SP, Rima. 2005, 1565 p.

ENVIRONMENTAL DATA SERVICE. **Pesticidas in drinking water linked to breast cancer.** ENDS Rep., 1995.

FARRÉ, M. J.; FRANCH, M. I.; MALATO, S.; AYLLO'N, J. A.; PERAL, J.; DOMÉNECH, X. Degradation of some biorecalcitrant pesticides by homogeneous and heterogeneous photocatalytic ozonation. **Chemosphere**, nº 58, p. 1127–1133, 2005.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da Atividade Estrogênica de 17β-estradiol e de 17αetinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂.** 2008, 173 f. Tese de doutorado em Ciências em Engenharia Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FILHO, R.W.R. **Hormônios estrógenos no rio do monjolinho São Carlos-SP: Uma avaliação da problemática dos desreguladores endócrinos ambientais.** 2008. 150f. Tese de doutorado em ciências da Engenharia Ambiental- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. E.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.

GEROLIN, E. R. R. **Ocorrência e Remoção de Disruptores Endócrinos em Águas Utilizadas para Abastecimento Público de Campinas e Sumaré - São Paulo.** 2008. 185 f. Tese de Doutorado em engenharia Civil - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova.** v. 30,

n. 3. 2007.

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)**. 2006.181 f. Tese de doutorado em química analítica - Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

GLAZE, W.H.; KANG, J.W. Advanced oxidation processes for treating groundwater contaminated with TCE e PCE: laboratory studies. **J. Am. Water Works Assoc.**, v. 5, p. 57, 1988.

GREGORASZCZUK, E.L.; RAK, A.; LUDEWIG, G.; GASINSKA, A. Effects of estradiol,PCB3, and their hydroxylated metabolites on proliferation, cellcycle, and apoptosis of human breast cancer cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 227–233, 2008.

HASHIMOTO, T.; TAKAHASHI, K.; MURAKAMI, T. Characteristics of estrogen decomposition by ozonation. **Water Sci. Technol.** v. 54, p. 87-93, 2006.

HOHENBLUM, P.; GANS, O.; MOCHE, W.; SCHARF, S.; LORBEER, G. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. **Science of the Total Environment**. n. 333, p. 185– 193, 2004.

HOHENBLUM, P.; GANS, O.; MOCHE, W.; SCHARF, S.; LORBEER,G. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface water in Austria. **Science of Total Environment** v. 333, p. 185-193, 2004.

HOLTHAUS, K. I. E.; JOHNSON, A. C.; JÜRGENS, M. D.; WILLIAMS, R. J.; SMITH, J. J.L.; CARTER, J. E. The potencial for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21, 12, p. 2526-2535, 2002.

HORWITZ, W.; KAMPS L.R.; BOYER, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 63, 1344, 1980.

HUBER, M. M.; TERNES, T. A.; GUTEN, U.V. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethinulestradiol. **Environ. Sci. Technol.** 38, 19, p. 5177-5186, 2004.

- IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, N. J.; EL-DIN, M.G. Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes; A Review. **Ozone Science e Engineering**. v. 28, p. 353-414, 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Março, 2003.
- IRMAK, S.; ERBATUR, O.; AKGERMAN, A. Degradation of 17 β -Estradiol and Bisphenol A in Aqueous Medium by Using Ozone and Ozone/UV Techniques. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 126, p. 54-62. 2005.
- ITOH, S.; UEDA, H.; NAASAKA, T.; NAKANISHI, G.; SUNITOMO, H. Evaluating variation of estrogenic effects by drinking water chlorination with the MVLN assays. **Water Science Technology**, v. 42, p.61, 2000.
- JASIM, S. Y.; IRABELLI, A.; YANG, P.; AHMED, S.; SCHWEITZER, L. Presence of Pharmaceuticals and Pesticides in Detroit River Water and Effect of Ozone on Removal. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, p. 415-423. 2006.
- JOHNSON, A.C.; AERNI, H.-R.; GERRITSEN, A.; GIBERT, M.; GIGER, W.; HYLLAND, K.; JURGENS, M.; NAKARI, T.; PICKERING, A.; SUTER, M.J.-F.; SVENSON, A.; WETTSTEIN, F.E. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. **Water Research**, v. 9, p. 47–58, 2005.
- JOHNSON A. C.; BELFROID A.; DI CORCIA A. Estimating steroid oestrogen input into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent. **Sci. Total Environ**. v. 256, p. 163- 173, 2000.
- JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C.R.; BRIGHTY, G.; SUMPER, J.P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environ. Sci. Technol**. v. 32, p. 2498-2506, 1998.
- JURGENS, M. D.; HOLTHAUS, K.I.E.; JOHNSON, A. C.; SMITH, J.J.L.; HETHERIDGE, M.; WILLIAMS, R. J. The Potential for Estradiol and Ethinylestradiol degradation in English Rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 21, 3, p. 480–488, 2002.
- KIM, S. E.; YAMADA, H.; TSUNO, H. Evaluation of Estrogenicity for 17 β -Estradiol Decomposition during Ozonation. **Ozone-Sci. Eng**. v. 26, p. 563-571, 2004.

KIM, S.D.; CHO, J.; KIM, I.S.; VANDERFORD, B.J.; SNYDER, S.A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in south Korean surface, drinking and waste waters. **Water Research**, v. 41, p. 1013- 1021, 2007.

KOMISSAROV, V.; ZIMIN, Y.; KHURSAN, S. On the mechanism of phenol ozonolysis. **Kinetics and catalysis**, v. 47, n. 6, p. 850-854. 2006.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. **Environ. Sci. Technol.** v. 35, p. 3201-3206, 2001

KUSTER, M.; AZEVEDO, D.A.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; AQUINO NETO, F.R.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, p. 997–1003, 2009.

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

LANÇAS, F. M.. **Extração em fase sólida**. São Carlos: Rima. 2004, 96 p.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R.; **Ozone in water treatment: application and engineering**. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan. 1991. 569 p.

LE CHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. Giardia and Cryptosporidium in raw and finished water. **Journal of the American Water Works Association**, v. 87, n.9, p.54-68, 1995.

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**, n° 38, p. 733-739, 2004.

LEE, H.B.; LIU, D. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage Bacteria. **Water, Air and Soil Pollution**. v. 134, p. 353-368, 2002.

LEINSTER, P.; MCINTYRE, A.E.; LESTER, J.N.; PERRY, R. Analysis of volatile organic compounds in Water, Wastewater and an industrial effluent. **Chemosphere**, n° 10, p. 291, 1981.

- LINHARES, E. 1993. Dosagens Hormonais em Ginecologia e Obstetrícia. Disponível em <<http://www.bragafilho.com.br/dosagens4/estradiol.html>>. Acesso em 01 de março de 2011.
- LIN, Y.; PENG, Z.; ZHANG, X. Ozonation of estrone, estradiol, diethylstilbestrol in waters. **Desalination**, v. 249, p. 235-240, 2009.
- LOOSE-MITCHELL, D.S., STANCEL, G.M. Estrogênios e progestogênios. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. **Goodman e Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica**. Tradução da 10. ed. Original, Carla de Mello Vorsatz et al.. 10 ed. McGraw-Hill, 2005. Cap. 58, p. 1201- 1229.
- LOPES, L.G. **Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – SP**. 2007. 121 f. Tese de doutorado em química. Universidade estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- MAIA, D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- MAI, J.; SUN, W.; XIONG, L.; LIU, Y.; NI, J. Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of 17 β -estradiol in aqueous solution. **Chemosphere** v. 73, p. 600-606, 2008.
- MANIERO, M.G.; BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. **Scienc of the Total environment**, v. 407, p. 105-115, 2008.
- MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters:sources, occurrence and analysis. **Trac- Trends Anal. Chem**, v.18, p. 417, 1999.
- MAZELLIE, P.; MÉITÉ, L.; LAAT, J. D. Photodegradation of the steroid hormones 17 β estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. **Chemosphere** v. 73, p. 1216-1223, 2008.
- MCCALLUM, E.A.; HYUNG, H.; DO, T.A.; HUANG, C.H.; KIM, J.H. Adsorption, desorption, and steady-state removal of 17 β -estradiol by nanofiltration membranes. **J. Membrane Sci.** v. 319, p. 38-43, 2008.
- MIERZWA, J.C. , AQUINO, S. F., VERAS, L. R. V. Remoção de Desreguladores

Endócrinos in: PÁDUA, V.L. (Coord.). **Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. Rio de Janeiro: ABES, 2009, p. 392.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).
Instrução Normativa Nº 46, 2003.

NAKAMURA, H.; KURUTO-NIWA, R.; UCHIDA, M.; TERAQ, Y. Formation of chlorinated estrones via hypochlorous disinfection of wastewater effluent containing estrone. **Chemosphere**, v. 66, p. 1441- 1448, 2007.

NAKAMURA, H.; SHIOZAWA, T.; TERAQ, Y.; SHIRAISHI, F.; FUKAZAWA, H., By-products produced by the reaction of estrogens with Hypochlorous Acid and their estrogen activities. **Journal of health science** v. 52, n. 2, p. 124- 131, 2006.

NISHIDA,K.; OHGAKI, S. Photolysis of aromatic chemical compounds in aqueous TiO₂ suspensions. **Water scienc technology**, v. 30, p. 39, 1994.

NOPPE, H.; VERSLYCKE, T.; WULF, E.; VERHEYDEN,K.; MONTEYNE, E.; CAETER, P. V.; JANSSEN, C. R.; DE BRABANDER, H. F. Ocurrance of estrogens in the Scheldt estuary: A 2- years survey. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 66, p. 1-8, 2007.

OHKO, Y.; IUCHI, K.; NIWA, C.; TATSUM A, T.; NAKASHIMA, T.; IGUCHI, T.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. 17 β -Estradiol Degradation by TiO Photocatalysis as a Means of Reducing Estrogenic Activity. **Environ. Sci. Technol.** v. 36, p. 4175-4181, 2002.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).
Draft report of the validation of the 21- day fish endocrine screening assay for the detection of endocrine active substances phase 2-testing negative substances. 68 p. 2007.

PEREZ, M. H.; PENUELA, G.; MALDONADO, M. I.; MALATO, O.; FERNANDEZ-IBANEZ, P.; OLLER, I.; GERNJAK, W.; MALATO, S. Degradation of pesticides in water using solar advanced oxidation processes. **Applied Catalysis B: Environmental**, n° 64, p. 272–281, 2006.

POSTIGO, C.; KUSTER, M.; VILLAGRASA, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BRIX, R.; FARRÉ, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D., 2009. Liquid chromatography-mass spectrometry methods for analysis of endocrine disrupting chemicals in

wastewaters in: Barceló, D. and Hansen, P. D. (Eds), The handbook of environmental chemistry. Biosensors for the environmental monitoring of aquatic systems. Springer-Verlag, Berlin, 227-272 p, 2009.

PRADO, J.; ARANTEGUI, J.; CHAMARO, E.; ESPLUGAS, S. Degradation of 2,4-D by ozone and light. **Ozone Sci. Eng.**, v. 16, p. 235, 1994.

RAIMUNDO, C.C.M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 108 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de Campinas- Instituto de química, Campinas, 2007.

RAVEN, P.H.; JOHNSON, G.B. **Biology**. 5th ed. Boston: WCB/McGraw-Hill; 1999.

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

REIS FILHO, R.W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E.M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v.2, n.3, p. 283-288, 2007.

REIS, F.P. **Apostila de INF 661- Estatística Aplicada**, Viçosa, 2000, 105 p.

RIBANI, M.; BOTOLLI, G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, 27, 5, p. 771-780, 2004.

RIVERA, J.; ELJARRAT, E.; ESPADALER, I.; MARTRAT, M.G.; CAIXACH, J. Determination of PCDF/PCDD in sludges from a drinking Water treatment plant- influence of chlorination treatment. **Chemosphere**, v. 34, p. 989, 1997.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELO, 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, 2004a.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Picogram per liter level determination of Estrogens in Natural Water and Waterworks by a Fully automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry method. **Anal. Chem.** v. 76, p. 6998 – 7006, 2004b.

SEGMULLER, B.E., ARMSTRONG, B.L., DUNPHY, R., OYLER, A.R. Identification of

autoxidation and photodegradation products of ethynylestradiol by on-line HPLC-NMR and HPLC-MS. **J. Pharmaceut. and Biomed.** v. 23, p. 927-937, 2000.

SETAC - SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY –
Endocrine disruptors and modulators. Technical Issue Paper (TIP), 2000.5p.

SNYDER, S.; VANDERFORD, B.; PEARSON, R.; QUINONES, O.; YOON, Y. Analytical Methods used to Measure Endocrine Disrupting Compounds in Water. **Practical periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management.** v. 7, n. 4, p. 224-234, 2003.

SNYDER, S.A.; WERT, E.C.; REXING, D.J.; ZEGERS, R.E.; DRURY, D.D. Ozone Oxidation of Endocrine Disruptors and Pharmaceuticals in Surface Water and Wastewater. **Ozone: Science and Engineering.** v. 28, p. 445 – 460, 2006.

SOARES, L. V. **Ozonização de Esgoto Sanitário: Estudo da hidrodinâmica, transferência de massa e inativação de microrganismos indicadores.** 2007. 248 f. Tese de doutorado em Hidráulica e Saneamento - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A.F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.

SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M.A.F.; JARDIM, W.F. Occurrence of emerging contaminants in brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. **Water Air Soil Poll.** v. 206, p. 57-67, 2010.

SOLÉ, M.; RALDUA, D.; BARCELÓ, D.; PORTE, C. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 56, p. 373, 2003.

SOUZA, J. B. G. **Estudo da ocorrência de estrógenos e tetraciclinas em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de campo grande (MS).** 2008. 161 f. Tese de doutorado. Instituto de química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SVENSON, A.; ALLARD, A.; MATS E.K. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. **Water Research,** v. 37, p. 4433–4443, 2003.

TABATA, A.; MIYAMOTO, N.; OHNISHI, Y.; ITOH, M.; YAMADA, T.; KAMEI, T.; MAGARA, Y. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum

vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Water Science and Technology**, 47, 9, p. 51-57, 2003.

TEIXEIRA, C.P.A.B., JARDIM, W.F. **Caderno temático. Processos Oxidativos Avançados. UNICAMP/IQ/LQA**. v. 3, 2004, 83, p.

TERNES, T.A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 91-99, 1999a.

TERNES, T.A.; STUMPF, U. M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999b.

THOMPSON, M.L.; CASEY, F.X.M.; KHAN, E.; HAKK, H.; LARSEN, G.L.; DESUTTER, T. Occurrence and pathways of manure-born 17 β -estradiol in vadose zone water. **Chemosphere** v. 76, p. 472-479, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual**. Abril, 1999. 346 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Ambient Water Quality Criteria for Chlorine**. Washington, DC, 1984. 57 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Microbial and Disinfection Byproduct Rules Simultaneous Compliance Guidance Manual**. 1999, 150p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **National primary drinking water regulations: interim enhanced surface water treatment; final rule**. Washington, DC, Federal Register, Rules and regulations, vol. 613 n. 241, 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis**. EPA/ 630/R-96/012, 1997, 111p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Ultraviolet light disinfection technologies in Drinking water applications: An Overview**, EPA

811/R-96/002. Washington, DC, 1996.

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

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

WALKER, D. The impact of disinfected treated wastewater in a raw-water reservoir. J. Chart. Inst. **Water environ. manage.** v.15, p. 9, 2001.

WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION. **Wastewater Disinfection – Manual of Practice.** 1996, 299p.

WATER ENVIRONMENT RESEARCH FOUNDATION. **Comparison of UV irradiation to Chlorination: Guidance for achieving optimal UV performance.** 1995.

WEBB, S.; TERNES, T.; GIBERT, M.; OLEJNICZAK, K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking Water. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 157-167, 2003.

WESTERHOFF, G.P., CHOWDHARY, Z.K. **Water treatment systems, in Water Resources handbook, Mays, L.W., Ed., McGraw-hill, New York, 1996, 171 p.**

WESTERHOFF, P.; YOON, Y.; SNYDER, S.; WERT, E. Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes. **Environ. Sci. Technol.** n. 39, p. 6649- 6663, 2005.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global assesement of the state of the science of endocrine diisruptors, 2002, 180p.

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

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

YOON, Y.; WESTERHOFF, P.; SNYDER, S.A.; WERT, E.C. Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. **J. Membrane Sci.** v. 270, p. 88-100, 2006.

ZHAO, Y.; HU, J.; JIN, W. Transformation of Oxidation Products and reduction of estrogenic Activity of 17 β -estradiol by aheterogeneous Photo-Fenton Reaction. **Environ. Sci. Technol.** v. 42, p. 5277-5284, 2008.

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

9 APÊNDICE

Tabela A1 - Análise de variância - concentração inicial 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g L}^{-1}$)

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f critico
A	2	633,7001	316,85	366,42527	3,89 *
B	1	1074,789	1074,789	1242,9535	4,75 *
AxB	2	590,4495	295,2248	341,41644	3,89 *
tratamento	5	2298,939	459,7877		
resíduo	12	10,37647	0,864706		
total	17	2309,315			

A: dose de cloro ($\text{mgCl}_2 \text{L}^{-1}$); B: tempo de contato (min); A x B: efeito da interação; * : significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Tabela A2 - Efeito da dose no tempo de contato - concentração inicial 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g L}^{-1}$)

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f critico
A	2	633,7001	316,85		
B A - 0,5	1	1211,829	1211,829	1401,4349	4,75 *
B A - 1,0	1	452,9337	452,9337	523,80093	4,75 *
B A - 2,0	1	0,476017	0,476017	0,5504956	4,75 ns
tratamentos	5	2298,939			
resíduo	12	10,37647	0,864706		
total	17	0			

B A - 0,5: dose de cloro de 0,5 $\text{mg Cl}_2 \text{L}^{-1}$; B A - 1,0: dose de cloro de 1,0 $\text{mg Cl}_2 \text{L}^{-1}$; B A - 2,0: dose de cloro de 2,0 $\text{mg Cl}_2 \text{L}^{-1}$; B: tempo de contato (min); * : significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns : não significativo

Tabela A3 - Efeito do tempo na dose - concentração inicial 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g L}^{-1}$)

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f critico
B	1	1074,789	1074,789		
A B-10	2	1223,452	611,7259	707,43827	3,89 *
A B-30	2	0,697717	0,348858	0,4034417	3,89 ns
tratamentos	5				
resíduo	12	10,37647	0,864706		
total	17	A dentro de B			

A B- 10: Tempo de contato de 10 min; A B - 30: tempo de contato de 30 min; A: dose de cloro ($\text{mg Cl}_2 \text{L}^{-1}$); * : significativo ao nível de 5 % de probabilidade; ns: não significativo

Tabela A4 - Análise de variância - concentração inicial 17 β -estradiol (1 $\mu\text{g L}^{-1}$)

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f crítico
A	2	301202,02	150601,01	88,185361	3,89 *
B	1	81471,0566	81471,0566	47,7058855	4,75 *
AxB	2	42825,5512	21412,7756	12,5383844	3,89 *
tratamento	5	425498,628	85099,7256		
resíduo	12	20493,3347	1707,77789		
total	17	445991,963			

A: dose de cloro ($\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$); B: tempo de contato (min); A x B: efeito da interação; * : significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Tabela A5 - Efeito do tempo na dose - concentração inicial 17 β -estradiol (1 $\mu\text{g L}^{-1}$)

NOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f crítico
B	1	81471,0566	81471,0566		
A B-10	2	248558,284	124279,142	72,7724269	3,89 *
A B-30	2	95469,2875	47734,6438	27,9513185	3,89 *
tratamentos	5				
resíduo	12	20493,3347	1707,77789		
total	17	A dentro de B			

A B- 10: Tempo de contato de 10 min; A B - 30: tempo de contato de 30 min; A: dose de cloro ($\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$); * : significativo ao nível de 5 % de probabilidade; ns: não significativo

Tabela A6 - Efeito da dose no tempo de contato - concentração inicial 17 β -estradiol (1 $\mu\text{g L}^{-1}$)

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f crítico
A	2	301202,02	150601,01		
B A - 0,5	1	35555,0092	35555,0092	20,8194575	4,75 *
B A - 1,0	1	88677,0482	88677,0482	51,9253989	4,75 *
B A - 2,0	1	64,5504	64,5504	0,03779789	4,75 ns
tratamentos	5	425498,628			
resíduo	12	20493,3347	1707,77789		
total	17	0			

B A - 0,5: dose de cloro de 0,5 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$; B A - 1,0: dose de cloro de 1,0 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$; B A - 2,0: dose de cloro de 2,0 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$; B: tempo de contato (min); * : significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns : não significativo

Tabela A7 - Análise de variância - concentração inicial de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f crítico
A	1	2431,964	2431,964	332,374	5,59 *
B	1	2185,866	2185,866	298,74	5,59 *
AxB	2	2400,293	1200,147	164,0228	4,74 *
tratamento	4	7018,124	1754,531		
resíduo	7	51,21866	7,316951		
total	11	7069,343			

A: dose de cloro ($\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$); B: tempo de contato (min); A x B: efeito da interação; * : significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela A8 - Efeito da dose no tempo de contato - concentração inicial de 100 µg L⁻¹ de estrona

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f critico
A	1	2431,964	2431,964		
B A - 1,0	1	4583,652	4583,652	715,9347	5,32 *
B A - 2,0	1	2,507773	2,507773	0,391697	5,32 ns
tratamentos	3	7018,124			
resíduo	8	51,21866	6,402332		
total	11	0			

B A - 1,0: dose de cloro de 1,0 mg L⁻¹; **B A - 2,0**: dose de cloro de 2,0 mg L⁻¹; **B A - 2,0**: dose de cloro de 2,0 mg L⁻¹; **B**: tempo de contato (min); * : significativo ao nível de 5% de probabilidade; **ns** : não significativo

Tabela A9 - Efeito do tempo de contato na dose - concentração inicial de 100 µg L⁻¹ de estrona

ANOVA					
FV	GL	SQ	QM	F	f critico
B	1	2185,866	2185,866		
A B-10	1	4832,206	4832,206	754,7571	5,32 *
A B-30	1	0,051894	0,051894	0,008105	5,32 ns
tratamentos	3				
resíduo	8	51,21866	6,402332		
total	11	A dentro de B			

A B - 10: Tempo de contato de 10 min; **A B - 30**: tempo de contato de 30 min; **A**: dose de cloro (mg L⁻¹); * : significativo ao nível de 5 % de probabilidade; **ns**: não significativo

Tabela A10 - Peso e número dos peixes por grupo e por tratamento - teste de ecotoxicidade

Tratamentos	Sexo	nº de peixes por grupo (início dos tra- tamentos)	Peso médio unitário (g) (início dos tratamentos)	nº de peixes por grupo (Fim dos tra- tamentos)	Peso médio unitário (g) (Fim dos tratamentos)
Controle da água de reconstituição	fêmea	9	0,455	9	0,2448
	macho	9	0,253	9	0,2154
Controle do cloro	fêmea	9	0,123	8	0,2951
	macho	9	0,147	9	0,2026
Controle do solvente (meOH)	fêmea	9	0,413	10	0,2124
	macho	9	0,125	8	0,164
Controle E2	fêmea	9	0,418	3	0,1425
	macho	9	0,157	1	0,0245
Sem tratamento Inicial - 1 µg L ⁻¹	fêmea	9	0,437	9	0,2685
	macho	9	0,263	9	0,1758
1 µg L ⁻¹ - 25% de água tratada	fêmea	9	0,279	11	0,2146
	macho	9	0,112	7	0,1554
1 µg L ⁻¹ - 50% de água tratada	fêmea	9	0,306	7	0,2858
	macho	9	0,127	8	0,1654
1 µg L ⁻¹ - 75% de água tratada	fêmea	9	0,447	9	0,2896
	macho	9	0,235	9	0,1748
1 µg L ⁻¹ - 100% de água tratada	fêmea	9	0,402	9	0,2396
	macho	9	0,274	9	0,1794
Sem tratamento Inicial - 100 ng L ⁻¹	fêmea	9	0,432	8	0,1797
	macho	9	0,310	10	0,1818
100 ng L ⁻¹ - 25% de água tratada	fêmea	9	0,430	10	0,2605
	macho	9	0,112	8	0,1732
100 ng L ⁻¹ - 50% de água tratada	fêmea	9	0,478	10	0,2885
	macho	9	0,140	7	0,1835
100 ng L ⁻¹ - 75% de água tratada	fêmea	9	0,476	8	0,3594
	macho	9	0,297	9	0,2303
100 ng L ⁻¹ - 100% de água tratada	fêmea	9	0,399	7	0,2353
	macho	9	0,115	11	0,151

Tabela A11- Cromatograma dos padrões dos subprodutos do estrona e do 17 β -estradiol feito por meio da extração on-line no equipamento LC/MS/MS

REC 2 (mistura)

07082010 05

REC 2 (mistura)

07082010 05

REC 2 (mistura)

REC 2 (mistura)