

REMOÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DE 17 β -ESTRADIOL E DE 17 α -
ETINILESTRADIOL PELOS PROCESSOS DE OZONIZAÇÃO E O₃/H₂O₂

Milena Guedes Maniero Ferreira

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof^ª. Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti, D.Sc.

Prof. José Roberto Guimarães, D.Sc.

Prof^ª. Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof^ª. Daniele Maia Bila, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2008

FERREIRA, MILENA GUEDES MANIERO

Remoção da Atividade Estrogênica de
17 β -Estradiol e de 17 α -Ethinilestradiol pelos
Processos de Ozonização e O₃/H₂O₂ [Rio de
Janeiro] 2008

XIX, 173 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,
Engenharia Química, 2008)

Tese - Universidade Federal do Rio de Ja-
neiro, COPPE

1. Ozonização
2. Desreguladores Endócrinos
3. Atividade Estrogênica

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Dedico esse trabalho a Yuri, aos meus pais Atílio e Isaura e aos meus irmãos Gustavo e Guilherme pelo carinho, amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Márcia Dezotti, pelo empenho, apoio e pela orientação dada durante a realização do trabalho.

Às grandes amigas Daniele Bila e Simone Vendramel por toda a ajuda, companheirismo e amizade.

Aos professores José Roberto Guimarães, Tito Lívio Moitinho, Selma Gomes Ferreira Leite e Daniele Maia Bila por terem aceito fazer parte da banca de tese.

Ao Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Júnior por todo o apoio, incentivo e sugestões dadas durante esses quatro anos.

À Prof.^a Débora de Azevedo do IQ/UFRJ pelas análises de GC/EM.

Ao meu marido Yuri pela paciência, compreensão, incentivo e ajuda.

Aos meus pais Atílio e Isaura, aos meus irmãos Gustavo e Guilherme pelo carinho e incentivo em mais essa etapa de minha vida.

Aos meus grandes amigos Natália, Joelmir, Ramirez e Biguá pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Poluição de Águas (PEQ/COPPE/UFRJ): Jackson, Daniele Santos, Alessandra, Amanda, Gustavo, Aline, Jardel, Antônio, Gelma, Rafael, João, Ana Lúcia, Claudinei e Luciana, pela amizade e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos pela ajuda nos ensaios de atividade estrogênica: Carol, Herval, Rossano, Cândida, Lívia e Sílvia.

Aos amigos do PEQ: Nilson, Luzia, Alexandre e Léo.

A todos os professores, funcionários e técnicos do PEQ/COPPE.

A Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

REMOÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DE 17 β -ESTRADIOL E DE 17 α -ETINILESTRADIOL PELOS PROCESSOS DE OZONIZAÇÃO E O₃/H₂O₂

Milena Guedes Maniero Ferreira

Março/2008

Orientadora: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Programa: Engenharia Química

Os estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol vêm sendo detectados em efluentes de estações de tratamento de esgoto e em águas superficiais e subterrâneas, devido às plantas de tratamento de esgotos removê-los apenas parcialmente durante o processo de tratamento, sendo em parte descartados nos corpos receptores. Esse trabalho teve como objetivo estudar a remoção da atividade estrogênica durante a degradação dos estrogênios 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e da mistura desses estrogênios em solução aquosa, pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂. Foram investigadas as influências do pH e da dosagem de ozônio na remoção dos estrogênios e da atividade estrogênica e na formação dos intermediários. Os resultados mostraram que os processos de ozonização e O₃/H₂O₂ foram efetivos na remoção desses estrogênios. Em pH 3, a atividade estrogênica foi totalmente removida, mesmo com baixas dosagens de ozônio (1 mg l⁻¹), tanto para o processo de ozonização quanto para O₃/H₂O₂. Entretanto, em pH 7 e 11 a estrogenicidade não foi completamente removida, provavelmente devido aos subprodutos formados pela oxidação via radical OH.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ESTROGENIC ACTIVITY REMOVAL OF 17 β -ESTRADIOL AND 17 α -ETHINYLESTRADIOL BY OZONATION AND O₃/H₂O₂ PROCESSES

Milena Guedes Maniero Ferreira

March/2008

Orientadora: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Department: Chemical Engineering

The estrogens 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol have been found in effluents from domestic wastewater treatment plants (DWTP) and in superficial and underground waters. These estrogens are partially degraded by processes employed in DWTP. Therefore are discharged in the receiving bodies. This work had as objective the study of estrogenic activity removal during the degradation of 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol and of the mixture of these estrogens in aqueous solution by ozonation and O₃/H₂O₂ processes. The influences of pH, ozone dosage, estrogenic activity removal and by-products formed were investigated. The results showed that ozonation and O₃/H₂O₂ processes were effective in the removal of these estrogens. In pH 3, the estrogenic activity was totally removed, even applying low ozone dosages (1 mg l⁻¹), for both ozonation and O₃/H₂O₂ processes. However, in pH 7 and 11 the estrogenicity was not completely removed, probably due the by-products formed by the oxidation through OH radical.

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Desreguladores Endócrinos	04
2.1.1. Definição de Desreguladores Endócrinos.....	06
2.1.2. Substâncias Conhecidas como Desreguladores Endócrinos.....	06
2.1.2.1. Estrogênios Naturais e Sintéticos.....	09
2.1.2.1.1. Propriedades Físico-Químicas.....	10
2.1.2.1.2. Excreção de Estrogênios por Homens e Mulheres.....	13
2.1.2.1.3. 17 β -Estradiol.....	14
2.1.2.1.4. 17 α -Ethinilestradiol.....	15
2.1.3. Mecanismos de Ação dos Desreguladores Endócrinos.....	16
2.1.4. Ocorrência de Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente.....	17
2.1.5. Efeitos Provocados pelos Desreguladores Endócrinos.....	25
2.1.5.1. Efeitos na Saúde Humana.....	25
2.1.5.2. Efeitos na Vida Animal.....	27
2.1.6. Determinação de Desreguladores Endócrinos.....	28
2.1.6.1. Determinação por Análises Químicas.....	29
2.1.6.1.1. Extração.....	29
2.1.6.1.2. Derivatização.....	30
2.1.6.2. Determinação da Atividade Estrogênica por Ensaio <i>In Vivo</i> e <i>In Vitro</i>	35
2.1.6.2.1. Ensaio <i>In Vivo</i>	36
2.1.6.2.2. Ensaio <i>In Vitro</i>	37
2.1.7. Atividade Estrogênica.....	40
2.1.7.1. Potencial Estrogênico.....	40
2.1.7.2. Combinação de Compostos Estrogênicos.....	44
2.1.7.2.1. Efeito Aditivo na Combinação de Compostos Estrogênicos.....	45

2.1.7.2.2. Efeito Sinérgico na Combinação de Compostos Estrogênicos.....	46
2.2. Degradação de Desreguladores Endócrinos.....	46
2.2.1. Ozonização.....	48
2.2.1.1. Ozônio.....	48
2.2.1.2. Geração de Ozônio.....	49
2.2.1.3. Decomposição do Ozônio em Fase Líquida	49
2.2.1.4. Aplicações do Ozônio.....	50
2.2.1.5. Degradação de Estrogênios por Ozonização.....	51
2.2.2. Processos Oxidativos Avançados.....	53
2.2.2.1. Ozônio/Peróxido de Hidrogênio.....	53
2.2.2.2. Degradação de Estrogênios por Processos Oxidativos Avançados.....	55
2.2.3. Degradação de Estrogênios por Processos Biológicos.....	55
2.2.4. Degradação de Estrogênios por Outros Processos.....	55
2.3. Remoção da Atividade Estrogênica por Diferentes Processos.....	63
2.4. Mecanismos de Reação de Estrogênios com Ozônio Molecular e Radicais OH.....	66
2.5. Subprodutos Formados durante a Oxidação de Estrogênios.....	73
2.6. Considerações Finais.....	77
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
3.1. Reagentes.....	79
3.2. Soluções de 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol.....	79
3.3. Sistema Experimental.....	79
3.4. Testes de Ozonização.....	81
3.4.1. Testes de Ozonização com Terc-Butanol.....	82
3.5. Metodologia Analítica.....	82
3.5.1. Determinação dos Estrogênios em Matrizes Aquosas.....	83
3.5.1.1. Extração em Fase Sólida.....	83
3.5.1.2. Derivatização.....	83
3.5.1.3. Cromatografia Gasosa.....	84
3.5.1.4. Avaliação da Recuperação no Processo de Extração e Limite de Quantificação da Metodologia.....	85

3.5.1.5. Identificação dos Produtos e Intermediários.....	86
3.5.2. Análise de Carbono Orgânico Dissolvido.....	87
3.6. Teste de Atividade Estrogênica.....	89
3.6.1. Cepa de levedura recombinante.....	89
3.6.2. Preparação das Soluções.....	90
3.6.3. Preparação do Meio de Cultivo.....	92
3.6.4. Propagação da Levedura.....	92
3.6.5. Preparação do Meio de Análise.....	92
3.6.6. Preparação das Amostras.....	93
3.6.7. Procedimento de Análise.....	94
3.7. Espectrometria de UV.....	97
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
4.1. Remoção dos Estrogênios 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol e da Mistura 17 β -Estradiol/17 α -Etinilestradiol.....	98
4.1.1. Remoção dos Estrogênios por Ozonização.....	99
4.1.2. Remoção dos Estrogênios pelo Processo de O ₃ /H ₂ O ₂	105
4.1.3. Remoção da Mistura de Estrogênios pelos Processos de Ozonização e O ₃ /H ₂ O ₂ na Presença de Terc-Butanol.....	108
4.2. Atividade Estrogênica.....	114
4.2.1. Comparação dos Potenciais Estrogênicos.....	115
4.2.2. Redução da Atividade Estrogênica pelo Processo de Ozonização.....	118
4.2.2.1. Avaliação da Concentração Equivalente de 17 β -Estradiol.....	123
4.2.2.2. Avaliação da Dosagem de Ozônio na Remoção da Atividade Estrogênica.....	126
4.2.2.3. Avaliação do pH na Remoção da Atividade Estrogênica.....	127
4.2.3. Comparação dos Processos de Ozonização e O ₃ /H ₂ O ₂	128
4.2.4. Classificação com Base na Estrogenicidade.....	133
4.2.5. Efeito do Radical OH na Redução da Atividade Estrogênica.....	135
4.3. Espectrometria de UV.....	137
4.4. Análise de Carbono Orgânico Dissolvido.....	144
4.5. Intermediários Propostos.....	146
4.5.1. Intermediários Propostos na Ozonização de 17 β -Estradiol.....	147
4.5.2. Intermediários Propostos na Ozonização de 17 α -Etinilestradiol.....	150

5. CONCLUSÕES.....	154
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Mecanismo de atuação dos desreguladores endócrinos (Bila, 2005)..	16
Figura 2.2. Esquema da contaminação das águas pelos hormônios (Stumpf <i>et al.</i> , 1999).....	19
Figura 2.3. Possíveis locais de ataque do O ₃ à molécula de (A) 17 α -etinilestradiol e (B) 17 β -estradiol (Huber <i>et al.</i> , 2003).....	67
Figura 2.4. Reações entre o ozônio e o fenol, segundo o mecanismo de Mvula e von Sonntag (2003).....	68
Figura 2.5. Produtos de oxidação formados da reação do ozônio com 17 β -estradiol e estrona (Huber <i>et al.</i> , 2004).....	69
Figura 2.6. Mecanismos da reação direta do ozônio com o anel fenólico de 17 β -estradiol (Irmak <i>et al.</i> , 2005).....	70
Figura 2.7. Mecanismo de degradação de 17 β -estradiol por fotocatalise com TiO ₂ proposto por Ohko <i>et al.</i> (2002).....	71
Figura 2.8. Mecanismo de reação para a ozonização do composto modelo THN (Huber <i>et al.</i> , 2004).....	72
Figura 2.9. Mecanismo de reação para a ozonização do composto modelo ECH (Huber <i>et al.</i> , 2004).....	72
Figura 3.1. Esquema do sistema de ozonização.....	80
Figura 3.2. Foto do sistema de ozonização.....	81
Figura 3.3. Esquema da metodologia analítica utilizada.....	82
Figura 3.4. Sistema de extração em fase sólida.....	84
Figura 3.5. Fluxograma da metodologia analítica utilizada para obtenção da remoção dos estrogênios e identificação dos subprodutos formados.....	88
Figura 3.6. Esquema do sistema de expressão do estrogênio na levedura. Em (1) o gene receptor de estrogênio humano é integrado no genoma principal, sendo capaz de ligar-se aos estrogênios. Em (2) ocorre a ativação do receptor (3) pela ligação do estrogênio, causando expressão do gene receptor da Lac-Z (4) o qual produz a enzima β -galactosidase. Esta enzima é excretada no meio (5) e metaboliza o substrato cromogênico CPRG (normalmente amarelo) em um produto vermelho (6) e essa mudança de coloração pode ser medida pela absorbância (Figura de Bila, 2005).....	91

Figura 3.7. Fluxograma da metodologia utilizada nos testes de atividade estrogênica.....	93
Figura 3.8. Placa utilizada nos testes de atividade estrogênica.....	94
Figura 3.9. Esquema do procedimento de análise do teste YES.....	95
Figura 3.10. Metodologia para Espectrometria de UV.....	97
Figura 4.1. Remoção de (A) 17 β -estradiol e de (B) 17 α -etinilestradiol pelo processo de ozonização em pH 3, 7 e 11.....	99
Figura 4.2. Remoção da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol pelo processo de ozonização em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	101
Figura 4.3. Consumo de ozônio durante a ozonização dos estrogênios nos três valores de pH investigados.....	103
Figura 4.4. Comparação do consumo de ozônio durante a ozonização dos estrogênios em mistura e separados, nos valores de (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	104
Figura 4.5. Remoção dos estrogênios (A) 17 β -estradiol e (B) 17 α -etinilestradiol pelo processo de O ₃ /H ₂ O ₂ (razão molar O ₃ /H ₂ O ₂ de 2:1), nos valores de pH 3 e 7.....	106
Figura 4.6. Remoção da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol pelo processo de O ₃ /H ₂ O ₂ (razão molar O ₃ /H ₂ O ₂ de 2:1) nos valores de pH 3 e 7.....	107
Figura 4.7. Consumo de ozônio durante a oxidação dos estrogênios pelo processo O ₃ /H ₂ O ₂ , nos valores de pH 3 e 7.....	107
Figura 4.8. Remoção da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol por ozonização na presença e ausência de terc-butanol (TBA), em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	110
Figura 4.9. Consumo de ozônio em função do tempo de ozonização para a ozonização da mistura de estrogênios (concentração inicial de 10 μ g l ⁻¹ de cada estrogênio) na presença e ausência de terc-butanol (TBA) em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	113
Figura 4.10. Estrutura dos hormônios (A) 17 β -estradiol e (B) 17 α -etinilestradiol.....	115
Figura 4.11. Curvas dose-respostas dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, obtidas pelo ensaio YES.....	116

Figura 4.12. Curvas dose-respostas de 17 β -estradiol (concentração no poço de 2,72 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 1,33 ng l^{-1}) e da combinação 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol (concentração no poço de 1,36 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 0,66 ng l^{-1} de cada estrogênio) obtidas pelo ensaio YES.....	117
Figura 4.13. Comparação das curvas dose-respostas de 17 β -estradiol e dos extratos das amostras de 17 β -estradiol (concentração inicial de 10 $\mu\text{g l}^{-1}$) ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	119
Figura 4.14. Comparação das curvas dose-respostas de 17 β -estradiol e dos extratos das amostras de 17 α -etinilestradiol (concentração inicial de 10 $\mu\text{g l}^{-1}$) ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	120
Figura 4.15. Comparação das curvas dose-respostas de 17 β -estradiol e dos extratos das amostras da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol (concentração inicial de 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cada) ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	121
Figura 4.16. EQ-E ₂ dos extratos das amostras ozonizadas de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol nos três valores de pH avaliados.....	124
Figura 4.17. Microplacas de 96 poços com a resposta do ensaio YES dos extratos das amostras de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol ozonizadas em pH 7 com: 1,0 mg l^{-1} de O ₃ (amostras A e C da placa A), 3,0 mg l^{-1} de O ₃ (amostras E e G da placa A), 5,5 mg l^{-1} de O ₃ (amostras A e C da placa B) e 12,5 mg l^{-1} de O ₃ (amostras E e G da placa B). As fileiras B, D, F e H são os brancos.....	126
Figura 4.18. Microplacas de 96 poços com a resposta no ensaio YES dos extratos das amostras de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol ozonizadas em: pH 3 e 4,5 mg l^{-1} de O ₃ (amostras A e C da placa A) e pH 3 e 7,5 mg l^{-1} de O ₃ (amostras E e G da placa A), pH 7 e 5,5 mg l^{-1} de O ₃ (amostras A e C da placa B) e pH 7 e 12,5 mg l^{-1} de O ₃ (amostras E e G da placa B), pH 11 e 6,0 mg l^{-1} de O ₃ (amostras A e C da placa C) e pH 11 e 15,0 mg l^{-1} de O ₃ (amostras E e G da placa C). As fileiras B, D, F e H são os brancos.....	127
Figura 4.19. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol tratadas por O ₃ e O ₃ /H ₂ O ₂ em pH 3, obtidas pelo ensaio YES.....	128

Figura 4.20. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol tratadas por O ₃ e O ₃ /H ₂ O ₂ em pH 7, obtidas pelo ensaio YES.....	129
Figura 4.21. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17 α -etinilestradiol tratadas por O ₃ e O ₃ /H ₂ O ₂ em pH 3, obtidas pelo ensaio YES.....	130
Figura 4.22. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17 α -etinilestradiol tratadas por O ₃ e O ₃ /H ₂ O ₂ em pH 7, obtidas pelo ensaio YES.....	131
Figura 4.23. Microplacas de 96 poços com a resposta no ensaio YES dos extratos das amostras 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol tratadas em pH 7 por: O ₃ com dosagem de 5,5 mg l ⁻¹ de O ₃ (amostras A e C da placa A) e O ₃ com dosagem de 12,5 mg l ⁻¹ de O ₃ (amostras E e G da placa A) e O ₃ /H ₂ O ₂ com dosagem de 6,0 mg l ⁻¹ de O ₃ (amostras A e C da placa B) e O ₃ /H ₂ O ₂ com dosagem de 14, 5 mg l ⁻¹ de O ₃ (amostras E e G da placa B). As fileiras B, D, F e H são os brancos.....	132
Figura 4.24. Classificação com base na estrogenicidade.....	133
Figura 4.25. Comparação das curvas dose-respostas de 17 β -estradiol e dos extratos das amostras da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol ozonizadas na presença e ausência do capturador de radicais OH (TBA) em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	136
Figura 4.26. Espectros de absorvância dos estrogênios (A) 17 β -estradiol e (B) 17 α -etinilestradiol.....	139
Figura 4.27. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17 β -estradiol ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	140
Figura 4.28. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17 β -estradiol tratadas por O ₃ /H ₂ O ₂ em (A) pH 3 e (B) pH 7.....	141
Figura 4.29. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17 α -etinilestradiol ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.....	142
Figura 4.30. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17 α -etinilestradiol tratadas por O ₃ /H ₂ O ₂ em (A) pH 3 e (B) pH 7.....	143

Figura 4.31. Carbono orgânico dissolvido em função do ozônio consumido da amostra de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol ozonizada em pH 7 (concentração inicial de 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cada estrogênio).....	145
Figura 4.32. Estrutura de 17 β -estradiol formada após derivatização com BSTFA.....	147
Figura 4.33. Espectros de massa de (A) 17 β -estradiol (derivatizado) obtido pelo CG/EM e de (B) Bis(trimetilsilil)estradiol obtido da biblioteca Nist.....	148
Figura 4.34. Estrutura de 17 α -etinilestradiol formada após derivatização com BSTFA.....	150
Figura 4.35. Espectro de massa do (A) 17 α -etinilestradiol (derivatizado) obtido pelo CG/EM e (B) 19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ine,3,17-bis (trimetilsilil) oxi-(17 α) obtido da biblioteca Nist.....	151

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Evolução cronológica de fatos e evidências relativos aos desreguladores endócrinos.....	05
Tabela 2.2. Lista de substâncias classificadas como desreguladores endócrinos.....	08
Tabela 2.3. Potenciais estrogênicos de algumas substâncias obtidos pelo ensaio YES (relativo à CE ₅₀ em mol l ⁻¹).....	09
Tabela 2.4. Estruturas químicas dos estrogênios 17β-estradiol, estrona, estriol e 17α-etinilestradiol e do colesterol.....	11
Tabela 2.5. Propriedades físico-químicas dos estrogênios estrona, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol.....	12
Tabela 2.6. Excreção diária (μg) per capita de estrogênios por humanos.....	13
Tabela 2.7. Diferentes mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.....	17
Tabela 2.8. Fontes de alguns desreguladores endócrinos.....	18
Tabela 2.9. Algumas fontes de hormônios.....	19
Tabela 2.10. Ocorrência de estrogênios em estações de tratamento de esgoto.....	21
Tabela 2.11. Ocorrência de estrogênios em águas superficiais e subterrâneas.....	23
Tabela 2.12. Métodos utilizados na determinação de estrogênios em amostras de água e efluentes.....	32
Tabela 2.13. Vantagens e desvantagens dos ensaios <i>in vivo</i>	37
Tabela 2.14. Vantagens e desvantagens dos ensaios <i>in vitro</i>	39
Tabela 2.15. Comparação do potencial estrogênico <i>in vivo</i> de alguns desreguladores endócrinos em termos de indução de vitelogenina.....	42
Tabela 2.16. Comparação do potencial estrogênico <i>in vitro</i> de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol.....	43
Tabela 2.17. Potencial de oxidação para oxidantes em água.....	48
Tabela 2.18. Degradação de estrogênios por ozonização.....	52
Tabela 2.19. Taxas de oxidação de compostos orgânicos com O ₃ e radicais OH..	54
Tabela 2.20. Taxa de oxidação de fármacos com o ozônio e radicais OH a temperatura ambiente.....	54
Tabela 2.21. Remoção de estrogênios por processos oxidativos avançados.....	56
Tabela 2.22. Remoção de estrogênios por processos biológicos.....	59

Tabela 2.23. Remoção de estrogênios por outros processos.....	62
Tabela 2.24. Redução da atividade estrogênica por processos oxidativos.....	64
Tabela 2.25. Constantes de reação entre os estrogênios com o ozônio (Deborde <i>et al.</i> , 2005).....	68
Tabela 2.26. Intermediários identificados ou propostos para a oxidação de 17 β - estradiol.....	73
Tabela 2.27. Intermediários propostos para a oxidação de 17 α -etinilestradiol (Huber <i>et al.</i> , 2004).....	76
Tabela 3.1. Condições cromatográficas utilizadas.....	85
Tabela 3.2. Condições de análise do sistema de CG/EM utilizadas.....	87
Tabela 4.1. Remoções dos estrogênios em mistura ozonizados em pH 7 e 11 na presença e ausência de terc-butanol.....	111
Tabela 4.2. Valores obtidos para CE ₅₀ e PR por regressão não linear.....	118
Tabela 4.3. Classificação das amostras oxidadas de 17 β -estradiol, 17 α - etinilestradiol e da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol com base na estrogenicidade.....	134
Tabela 4.4. Subprodutos propostos na ozonização de 17 β -estradiol nos diferentes valores de pH investigados.....	149
Tabela 4.5. Subprodutos propostos na ozonização de 17 α -etinilestradiol nos diferentes valores de pH investigados.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
A _{corr}	Absorbância Corrigida
ADO	Androsta 4,16–dien–3–ona
BPA	Bisfenol A
BSTFA	N,O-bis(trimetil)ililtrifluoroacetamida
C ₁₈	Octadesilsilano
CE ₅₀	Concentração que elucida 50 % da atividade
CG	Cromatografia Gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG/EM/EM	Cromatografia gasosa acoplada a dois espectrômetros de massas em série
C ₄ H ₉ OH	terc-butanol
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas
CLAE/EM/EM	Cromatografia líquida de alta performance acoplada a dois espectrômetros de massas em série
CL/EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
ClO ₂	Dióxido de Cloro
CO ₂	Dióxido de Carbono
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COT	Carbono Orgânico Total
CPRG	Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosida
DDE	2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno
DDT	2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano
DE	Desregulador Endócrino
DEO	10ε-17β-dihidroxi-1,4-estradieno-3-ona
DES	Dietilestilbestrol
DIC	Detector por Ionização em chama
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E°	Potencial de Oxidação
E ₁	Estrona
E ₂	17β-estradiol
E ₃	Estriol
ECH	1 etinil-1-ciclohexanol
EDC	Endocrine Disrupting Chemicals
EDSP	Endocrine Disruptor Screening Program
EE ₂	17α-etinilestradiol
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Dois espectrômetros de massa em série
ENV	Resina de copolímero poliestireno
EQ-E ₂	Equivalente de 17β-estradiol
ETE	Estações de Tratamento de Esgoto
HO•	Radical Hidroxila
HO ₂ •	Radical hidroperoxila

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
IQ/EM	Espectrometria de massa por ionização química
K _{oc}	Coefficiente de sorção
K _{O3}	Constantes das taxas de reação de compostos orgânicos com o ozônio
K _{OH}	Constantes das taxas de reação de compostos orgânicos com o radical OH
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
MSTFA/TMSI/DTE	N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoacetamida/trimetilsililimidazola/ditioeritrol
MTBFA	N-metil-N-terc-butildimetilsilil-trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-metil-N-(terc-butildimetiltrifluoroacetamida)
NP	Nonilfenol
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
OECD	European Organization for Economic Co-operation and Development
OH	Hidroxila
OP	Octilfenol
PAH	Hidrocarbonetos Poliaromáticos
PCB	Bifenilas policloradas
PCP	Pentaclorofenol
PFBBR-TMS	Pentafluorbenzilbromado-trimetilsilil
PFB-TMS	Pentafluorbenzil-trimetilsilil
PFPA	Ácido pentafluorpropiónico
PLRPS	Copolímero de estireno-divinilbenzeno
POA	Processos Oxidativos Avançados
PR	Potência Relativa estrogênica
RE	Receptor de Estrogênio
REh	Receptor de Estrogênio Humano
SDB-XC	Disco de poliestireno divinilbenzeno
TBA	terc-butanol
<i>t</i> -BDMS	Grupo <i>t</i> -butildimetilsilil
THN	5,6,7,8-tetrahidro-2-naftol
TiO ₂	Dióxido de Titânio
TMS	Grupo trimetilsilil
USEPA	United State Environmental Protection Agency
USGS	United State Geological Survey
UV	Radiação Ultravioleta
VTG	Vitelogenina
YES	Yeast estrogen-inducible expression system ou recobinant yeast estrogenic system

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Um dos campos mais proeminentes da área ambiental é o estudo de micropoluentes orgânicos presentes em ambientes aquáticos. Recentemente, estudos mostraram mudanças na reprodução de animais e humanos, possivelmente devido à presença de alguns micropoluentes (conhecidos como desreguladores endócrinos) em águas superficiais e subterrâneas.

O problema dos desreguladores endócrinos é evidente desde o início dos anos 1900, mas, recentemente, esse fenômeno tornou-se um dos principais assuntos nas áreas ambiental e médica, gerando uma grande atenção das comunidades científicas do mundo todo e um interesse considerável da mídia, devido ao fato de somente agora estudos científicos terem comprovado a seriedade e a diversidade dos problemas que podem advir da exposição a estas substâncias.

Desde 1996, o Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) tem considerado a problemática dos desreguladores endócrinos como uma das seis áreas de pesquisa mais importantes (Adams *et al.*, 2005).

Estudos encontrados na literatura mostram que os desreguladores endócrinos são suspeitos de provocar desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, de útero e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento de incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas tireóides, distúrbios nas funções do ovário (crescimento folicular e a ovulação), na fertilização e gravidez. Em animais podem desregular a reprodução e o desenvolvimento dos organismos, assim como, induzirem, irreversivelmente, características sexuais femininas em peixes machos, podendo levar a esterilização ou redução da reprodução (Coleman *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 1997).

Várias são as substâncias classificadas como desreguladores endócrinos. Dentre elas, substâncias naturais (fitoestrogênios), substâncias químicas sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas e bisfenol A), estrogênios naturais (17 β -estradiol, estrona e estriol) e estrogênios sintéticos (17 α -etinilestradiol).

Os estrogênios, principalmente 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol, por possuírem alto potencial estrogênico, têm sido classificados como os maiores responsáveis em provocar alterações endócrinas em organismos presentes em águas superficiais.

A estrogenicidade é a capacidade de uma substância acoplar-se ao receptor de estrogênio e elucidar uma resposta estrogênica. É definida, segundo Daston *et al.* (1997), como a capacidade de produção de respostas biológicas qualitativamente similares àquelas produzidas pelos hormônios endógenos.

17β -estradiol e 17α -etinilestradiol são excretados diariamente, por humanos e animais, no esgoto doméstico. Essas substâncias vêm sendo detectadas em efluentes de estações de tratamento de esgoto e em águas superficiais, devido às plantas de tratamento de esgoto receberem esses estrogênios e apenas eliminá-los parcialmente durante o processo de tratamento, sendo o residual descartado nos corpos receptores (Ternes *et al.*, 1999b).

17β -estradiol é o principal estrogênio natural, responsável pela formação das características femininas. 17α -etinilestradiol é o principal estrogênio sintético, encontrado nas pílulas anticoncepcionais e aplicado nas terapias de reposição hormonal.

A presença desses hormônios em estações de tratamento de esgoto e em águas subterrâneas e superficiais mostra a necessidade de uma avaliação dos processos de tratamento que já vem sendo utilizados com respeito à eficiência de remoção dessas substâncias, uma vez que, segundo estudos, $0,1 \text{ ng l}^{-1}$ de 17α -etinilestradiol induz a expressão de vitelogenina em peixes, $0,1$ a 15 ng l^{-1} pode afetar a diferenciação sexual e 2 a 10 ng l^{-1} pode afetar a fecundidade (Fent *et al.*, 2006). Portanto, concentrações normalmente encontradas no meio ambiente ($0,5$ a 7 ng l^{-1}) são capazes de provocar disfunções no sistema reprodutivo de peixes.

Processos como a ozonização e os processos oxidativos avançados (POA), como a fotocatalise, fotólise, $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ e O_3/UV , são tecnologias que têm se mostrado bastante promissoras na remoção desses micropoluentes presentes em amostras ambientais (Bila *et al.*, 2007; Irmak *et al.*, 2005; Ternes *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2003; Zwiener e Frimmel, 2000).

Diante do exposto, esse trabalho teve por objetivo geral estudar a degradação dos estrogênios 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar as influências do pH e da dosagem de ozônio na remoção desses estrogênios, da atividade estrogênica e na formação dos subprodutos;
- Avaliar qual processo oxidativo, entre a ozonização e O₃/H₂O₂, foi mais efetivo na remoção dos estrogênios e da estrogenicidade;
- Investigar o efeito na atividade estrogênica da combinação dessas substâncias estrogênicas;
- Avaliar o efeito do ozônio molecular e do radical hidroxila na remoção da atividade estrogênica;
- Avaliar a concentração de carbono orgânico dissolvido com o objetivo de verificar se os processos oxidativos foram capazes de mineralizar os estrogênios;
- Obter as varreduras de UV para verificar se os processos avaliados foram capazes de degradar o anel fenólico, resultando na perda da atividade estrogênica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desreguladores Endócrinos

Um dos principais enfoques científicos internacionais da última década diz respeito à presença, no meio ambiente, de um grupo específico de compostos químicos caracterizado pela capacidade de simular ou alterar a atividade hormonal de humanos e de outros animais. A estes compostos, denominados genericamente de desreguladores endócrinos (DE), atribui-se a capacidade de desregular o sistema endócrino. Essas substâncias mimetizam a ação de hormônios naturais, inibindo-os ou alterando as funções regulares normais dos sistemas imunológico, nervoso e endócrino (Castro, 2002).

Estudos relativos à hipótese de que substâncias químicas no ambiente podem estar relacionadas a efeitos estrogênicos vêm sendo relatados desde 1923 (Allen e Doisy, 1923; Burlington e Lindeman, 1950) (apud Baker, 2001). Entretanto, somente nos últimos 10 anos a preocupação de órgãos ambientais tornou-se mais evidente. Em função disso, foram desenvolvidos vários trabalhos com o objetivo de avaliar os efeitos adversos dessas substâncias à saúde humana e à vida de animais. Na Tabela 2.1 é mostrada uma evolução cronológica de fatos e evidências relativos aos desreguladores endócrinos.

A exposição a essas substâncias pode ocorrer a partir de uma variedade de fontes, de forma voluntária ou não. Assim, homens e animais estão expostos a alguns fitoestrogênios com o consumo de água potável ou pelo contato com o ar e solo. Também estão expostos a muitos DE sintéticos ao utilizar produtos comerciais, como produtos de limpeza, pesticidas, aditivos alimentares e cosméticos (Castro, 2002).

Muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de identificar esses micropoluentes, verificar sua ocorrência, destino e os efeitos provocados em animais e homens, uma vez que são encontrados em estações de tratamento de esgoto e em águas superficiais, subterrâneas e potáveis.

Tabela 2.1. Evolução cronológica de fatos e evidências relativos aos desreguladores endócrinos.

Ano	Fato ou Evidência
1923	Detecta-se atividade estrogênica em extratos biológicos.
1950	Observa-se que o DDT apresenta atividade estrogênica.
1962	Surgem as primeiras correlações entre pesticidas e problemas na saúde de animais.
1963	Verifica-se que a exposição a hormônios naturais é perigosa e conduz ao câncer.
1968	Descobre-se que o DDT apresenta atividade estrogênica nos mamíferos e aves.
1971	Verifica-se que o DES leva ao câncer vaginal, sobretudo em mulheres cujas mães estiveram expostas a este produto durante a gravidez.
1972	DDT é proibido na agricultura.
1976	Verifica-se que o DDE está relacionado a problemas na reprodução humana.
1977	A produção e aplicação de bifenilas policloradas são restringidas.
1980	A utilização de certos hormônios sintéticos é restringida.
1993	Detecta-se relação entre xenoestrogênios e problemas no aparelho reprodutor masculino e feminino.
1996	Verifica-se que combinações de diversos xenoestrogênios apresentam sinergismos em diversos tipos de levedura.
1998	São formados os primeiros grupos de investigação a nível mundial para estudar esse problema.
1999	Desenvolvem-se estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para avaliar o potencial estrogênico de substâncias.

Fonte: Nogueira (2003).

2.1.1. Definição de Desreguladores Endócrinos

Segundo a “U.S. Environmental Protection Agency” (EPA), um desregulador endócrino é um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos (U.S. Environmental Protection Agency, 1997).

Desregulador endócrino é o termo associado a toda substância ou mistura de substâncias exógenas capaz de assumir função idêntica de um hormônio natural nos seres vivos ou inibir o funcionamento normal do mesmo, alterando as funções do sistema endócrino e causando efeitos adversos nos organismos ou em seus descendentes (Waring e Harris, 2005; Nogueira, 2003).

Em geral, os desreguladores endócrinos são compostos muito estáveis e lipofílicos. A função hormonal mais afetada por estes agentes é o mecanismo de regulação dos esteróides, que determinam principalmente as características sexuais e comportamentais das espécies (Nogueira, 2003).

Os desreguladores endócrinos atuam pela ligação aos receptores de esteróides, podendo alterar o funcionamento do sistema reprodutivo e causar feminização de espécies. A ligação ao receptor da tireóide pode desregular o sistema neuroendócrino. Recentemente, foi mostrado que esses compostos podem alterar a síntese e o metabolismo de estrogênios (Waring e Harris, 2005).

2.1.2. Substâncias Conhecidas como Desreguladores Endócrinos

Coletivamente conhecidos como “endocrine-disrupting chemicals” (EDC), os desreguladores endócrinos representam uma gama extensiva de substâncias e podem ser produtos naturais, como os fitoestrogênios (isoflavonas, lignanos e coumestanos), produzidos pelas próprias plantas e bastante comuns em produtos de origem animal e vegetal, ou compostos químicos sintéticos (xenoestrogênios), na sua grande maioria organoclorados, empregados nos mais variados usos industriais, comerciais e domésticos (detergentes (surfactantes), resinas, aditivos e monômeros utilizados na produção de plásticos).

Alguns xenoestrogênios são produzidos intencionalmente, como no caso de solventes clorados e inseticidas, desenvolvidos para atuar seletivamente sobre o sistema endócrino de insetos específicos, enquanto outros são formados como subprodutos durante o processo industrial, sendo descartados em águas superficiais devido a sua incompleta remoção nas estações de tratamento de efluentes.

Os hormônios presentes em cosméticos e anabolizantes utilizados em rações animais também são considerados desreguladores endócrinos (Alves *et al.*, 2007). Diclorodifeniltricloroetano (DDT), bifenilas policloradas (PCB), bisfenol A, alquilfenóis-polietoxilatos, p-dioxina e dibenzenofurano, são exemplos de compostos sintéticos suspeitos de serem desreguladores endócrinos. Bisfenol A é um ingrediente comumente encontrado nos “vernizes” empregados em tratamentos dentários e em revestimentos internos de recipientes para embalagem de alimentos, facilitando a contaminação humana diretamente ou por ingestão dos alimentos contaminados (Gascon *et al.*, 1997). Na Tabela 2.2 é mostrada uma lista com algumas substâncias classificadas como desreguladores endócrinos.

Embora algumas substâncias naturais de origem vegetal (os fitoestrogênios) possuam propriedades endócrinas, estas geralmente não causam tantos problemas ao homem quanto àquelas de origem antropogênica, uma vez que essas substâncias não se ligam fortemente aos receptores hormonais, sendo facilmente excretadas e conseqüentemente, não se acumulam nos tecidos corpóreos (Meyer *et al.*, 1999).

Por outro lado, as substâncias sintéticas com ação desreguladora são geralmente persistentes no ambiente, acumulam-se no solo e nos sedimentos, são transportadas para outras regiões pela atmosfera e podem acumular-se ao longo da cadeia trófica, expondo os animais superiores a maiores riscos. Várias destas substâncias podem ser excretadas por meio do leite materno, constituindo-se, assim, uma fonte de contaminação para recém-nascidos (Meyer *et al.*, 1999).

Tabela 2.2. Lista de substâncias classificadas como desreguladores endócrinos.

Esteróides	Alquilfenóis	Compostos Poliaromáticos	Compostos Orgânicos Oxigenados	Pesticidas
17 α - etinilestradiol	Nonilfenol	Bifenilas Policloradas (PCB)	Ftalatos	Atrazina
17 β -estradiol	Nonilfenol etoxilado	Retardantes de Chama	Bisfenol A	Linuron
Estrona	Octilfenol	Hidrocarbonetos Poliaromáticos (PAH)		Hexacloro- benzeno
Mestranol				Pentacloro- fenol (PCP)
Dietilestilbestrol (DES)				

Fonte: Birkett e Lester (2003).

Os estrogênios têm sido classificados como os maiores contribuidores, dentre os desreguladores endócrinos, em provocar alterações endócrinas em organismos presentes em águas superficiais (Gomes *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2002; Johnson e Sumpter, 2001). Isso ocorre porque os estrogênios naturais e sintéticos são efetivos em níveis de ng l⁻¹, enquanto que a maioria dos compostos químicos apresenta atividade estrogênica em níveis de $\mu\text{g l}^{-1}$ e o sistema hormonal dos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações de esteróides, da ordem de partes por bilhão (ppb) ou partes por trilhão (ppt) (Nogueira, 2003; Routledge *et al.*, 1998).

Estrogênios naturais e sintéticos exibem atividade estrogênica na faixa de cem a um milhão de vezes maior que a apresentada por compostos químicos (Routledge e Sumpter, 1996; Tanaka *et al.*, 2001), razão pela qual esses estrogênios causam anomalias em organismos aquáticos em baixíssimas concentrações. Na Tabela 2.3 tem-se a comparação dos potenciais estrogênicos de algumas substâncias estrogênicas.

Tabela 2.3. Potenciais estrogênicos de algumas substâncias obtidos pelo ensaio YES (relativo à CE₅₀ em mol l⁻¹).

Substância	Potência Relativa
17β-estradiol	1,00
17α-etinilestradiol	0,75
Estrona	0,20
Estriol	8,18 10 ⁻³
Genisteína	1,80 10 ⁻⁴
Daidzeína	3,00 10 ⁻⁶
Bisfenol A	1,20 10 ⁻⁴
4-Nonilfenol	2,57 10 ⁻⁵
4-terc-Octilfenol	5,81 10 ⁻⁶

Fonte: Beck *et al.* (2006).

2.1.2.1. Estrogênios Naturais e Sintéticos

Os estrogênios naturais 17β-estradiol (E₂), estriol (E₃) e estrona (E₁) e o sintético 17α-etinilestradiol (EE₂), desenvolvido para uso médico em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos, são os que despertam maior preocupação, tanto pela sua potência, como pela quantidade continuamente introduzida no ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos desreguladores desencadeados pela disposição de efluentes.

O uso cada vez maior de pílulas anticoncepcionais resulta em uma maior preocupação em relação aos problemas causados pelos desreguladores endócrinos, uma vez que concentrações muito baixas de 17α-etinilestradiol têm provocado efeitos alarmantes no processo de reprodução e desenvolvimento de organismos.

Todos os hormônios esteróides exercem sua ação pela passagem através da membrana plasmática e ligando-se a receptores intracelulares (Ying *et al.*, 2002). Os hormônios esteróides são um grupo de compostos biologicamente ativos que são

sintetizados a partir do colesterol e têm em comum uma estrutura constituída de três anéis hexagonais e um anel pentagonal.

Os estrogênios são caracterizados por seu anel fenólico, o qual tem um grupamento hidroxila responsável pela atividade biológica, ou seja, pela atividade estrogênica. As estruturas químicas dos estrogênios 17β -estradiol, estrona, estriol e 17α -etinilestradiol e do colesterol são mostradas na Tabela 2.4.

2.1.2.1.1. Propriedades Físico-Químicas

Na Tabela 2.5 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas dos estrogênios naturais (estrona e 17β -estradiol) e do estrogênio sintético 17α -etinilestradiol.

Dessas propriedades físico-químicas, em especial o K_{ow} (coeficiente de partição octanol-água), observa-se que esses estrogênios são compostos orgânicos hidrofóbicos, moderadamente solúveis em água e que preferencialmente adsorvem em sedimentos/partículas sólidas. Portanto, é de se esperar que a adsorção no solo, ou sedimento ou lodo biológico seja um significativo fator da redução da concentração desses estrogênios na fase aquosa (Lai *et al.*, 2000; Urase e Kikuta, 2005).

Provavelmente, durante o tratamento biológico, parte desses estrogênios fica retida no lodo biológico (na camada lipídica das células), devido à sua hidrofobicidade, podendo ocorrer, conseqüentemente, bioacumulação (Olea *et al.*, 2002; Johnson e Sumpter, 2001; Andersen *et al.*, 2005). Andersen *et al.* (2003b) verificaram que não existe um equilíbrio entre os níveis de hormônios na fase líquida e na fase sólida (no lodo).

Tabela 2.4. Estruturas químicas dos estrogênios 17β-estradiol, estrona, estriol e 17α-etinilestradiol e do colesterol.

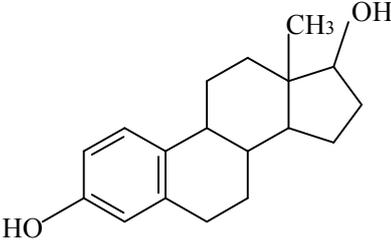
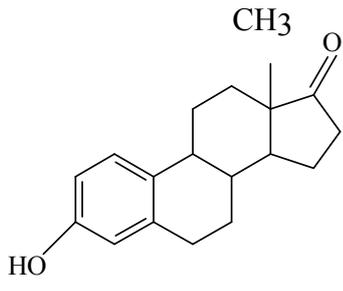
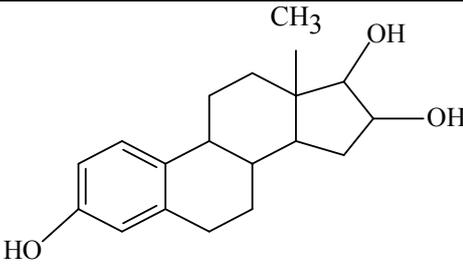
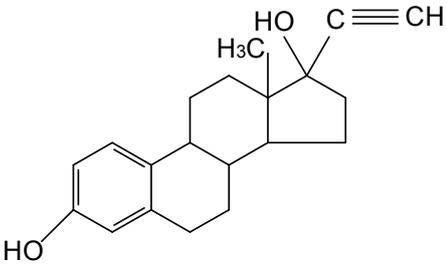
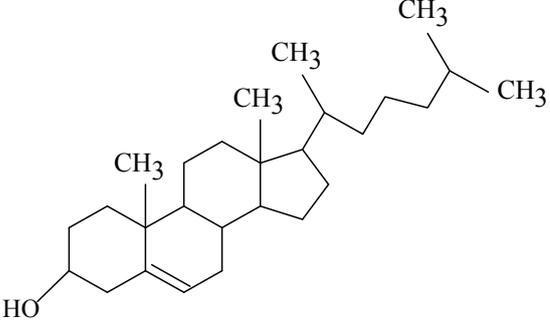
Composto	Estrutura Química
17β-estradiol	
Estrona	
Estriol	
17α-etinilestradiol	
Colesterol	

Tabela 2.5. Propriedades físico-químicas dos estrogênios estrona, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol.

Parâmetro	Estrona (E₁)	17β-estradiol (E₂)	17α-etinilestradiol (EE₂)
Nome	1,3,5(10)-estratriene-3-ol-17-one	1,3,5(10)-estratriene-3,17β-diol	17α-etinil-1,3,5(10)-estratriene-3,17β-diol
Número CAS	53-16-7	50-28-2	57-63-6
Fórmula Molecular	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Massa Molar (g mol ⁻¹)	270,4	272,4	296,4
Ponto de Ebulição (°C)	258-260	178-179	182-183
Massa Específica (20°C)	1,164	1,170	1,210
Solubilidade (mg l ⁻¹) (a 20°C)	13	13	4,8
Pressão de Vapor (mm Hg)	2,3.10 ⁻¹⁰	2,3.10 ⁻¹⁰	4,5.10 ⁻¹¹
logK _{ow} (coeficiente de partição octanol-água)	3,4	3,1	3,9
K _{oc} (coeficiente de sorção)	4882	3300	4770
Meia-Vida (dias)	2 - 3	2 - 3	4 - 6

Fonte: Feng *et al.* (2005a), Ying *et al.* (2002), Lai *et al.* (2000).

2.1.2.1.2. Excreção de Estrogênios por Homens e Mulheres

A produção de estrogênios por homens e mulheres varia em função de fatores como gênero, idade e ciclo reprodutivo. Mulheres produzem e excretam mais estrogênios do que os homens e a produção é mais abundante durante a fase fértil do que no período pós-menopausa. A maioria dos estrogênios naturais tem vida curta e não acumulam nos tecidos. Por outro lado, estrogênios sintéticos como 17 α -etinilestradiol e dietilstilbestrol (DES) são mais estáveis e permanecem no corpo mais tempo do que os estrogênios naturais (Tapiero *et al.*, 2002).

Baseado em pesquisas e medições prévias da excreção de estrogênios por humanos, Johnson *et al.* (2000) estimaram a excreção diária de estrogênios por homens e mulheres, cujos valores são mostrados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Excreção diária (μg) *per capita* de estrogênios por humanos.

	17β-estradiol	Estrona	Estriol	17α-etinilestradiol
Homens	1,6	3,9	1,5	-
Mulheres na Fase Fértil (15 a 59 anos)	3,5	8	4,8	-
Mulheres na menopausa (acima de 59 anos)	2,3	4	1	-
Gestantes	259	600	6000	-
Mulheres que tomam contraceptivo	-	-	-	35

Fonte: Johnson *et al.* (2000).

Para estimar a concentração de estrogênios 17 β -estradiol, estrona e estriol descartada no ambiente, Johnson *et al.* (2000) propuseram as Equações 2.1 a 2.3, respectivamente. Cabe ressaltar que essas equações apenas estimam os valores, uma vez

que existe grande incerteza em relação à estrutura da população e aos valores de excreção.

$$E_2(\text{ng.l}^{-1}) = \frac{P}{262,8.F} \quad (2.1)$$

$$E_1(\text{ng.l}^{-1}) = \frac{P}{114,3.F} \quad (2.2)$$

$$E_3(\text{ng.l}^{-1}) = \frac{P}{23,64.F} \quad (2.3)$$

sendo, P é o número de pessoas da população que são servidas pela estação de tratamento de esgoto doméstico e F é a vazão ($\text{m}^3 \text{dia}^{-1}/1000$).

Os estrogênios são excretados pelo corpo principalmente como formas biológicas inativas conjugadas (sulfatos e glucuronides). Os estrogênios conjugados não possuem atividade biológica direta, porém, uma grande proporção presente no esgoto é provavelmente desconjugada pelas bactérias fecais (*Escherichia coli*) antes de alcançar as estações de tratamento de esgotos (Coleman *et al.*, 2004; D'Ascenzo *et al.*, 2003; Baronti *et al.*, 2000). Os estrogênios conjugados na forma de glucuronides são muito menos recalcitrantes a degradação biológica no esgoto do que os estrogênios sulfatados (D'Ascenzo *et al.*, 2003).

2.1.2.1.3. 17 β -Estradiol

17 β -estradiol é o principal estrogênio humano. Possui alto potencial estrogênico e é utilizado como padrão (controle positivo) na medida da atividade estrogênica por ensaios *in vivo* e *in vitro* (Coldham *et al.*, 1997). Possui 18 carbonos com um anel fenólico que é o componente estrutural responsável pela alta afinidade em ligar-se ao receptor de estrogênio e elucidar a resposta estrogênica (Huber *et al.*, 2003). Dessa forma, processos que sejam capazes de alterar o anel fenólico tendem a ser efetivos na remoção do seu potencial estrogênico.

Essa substância exibe alta atividade estrogênica mesmo em concentrações muito baixas (aproximadamente 10^{-9} mol l⁻¹ para ensaios *in vitro*). É o hormônio responsável pela formação das características femininas, comportamento sexual, ciclo menstrual e ovulação. Influencia a formação óssea, sistema cardiovascular, memória, pele e sistema imunológico (Nogueira, 2003; Kuster *et al.*, 2004; Nghiem *et al.*, 2004; Tapiero *et al.*, 2002; Routledge e Sumpter, 1996).

2.1.2.1.4. 17 α -Etinilestradiol

17 α -etinilestradiol é o principal estrogênio sintético, sendo encontrado nas pílulas anticoncepcionais e aplicado nas terapias de reposição hormonal. Esse estrogênio é um dos desreguladores endócrinos mais importantes encontrado no ambiente aquático, devido ao fato de ser altamente estrogênico e resistente à biodegradação.

Os estrogênios sintéticos geralmente são mais estáveis em água do que os estrogênios naturais e possuem alto potencial estrogênico, conforme estudos de Snyder *et al.* (1999) e Liu e Liu (2004). Estudos relatam que 17 α -etinilestradiol é muito mais resistente à biodegradação em estações de tratamento de efluentes do que os estrogênios naturais devido à presença do grupo etinil (Cargouët *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2000; Johnson e Sumpter, 2001; Servos *et al.*, 2005; Jürgens *et al.*, 2002). Jürgens *et al.* (2002) mostraram que 17 α -etinilestradiol é o mais potente desregulador endócrino para peixes.

As estruturas dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol foram apresentadas na Tabela 2.4. Comparando-se as estruturas químicas dessas substâncias, observa-se a semelhança desses estrogênios. A única diferença está no anel de cinco membros, uma vez que na estrutura de 17 α -etinilestradiol existe a presença de um grupo etileno e de uma hidroxila ligada a esse anel, enquanto que para 17 β -estradiol só existe uma hidroxila ligada ao anel de cinco membros. Pode-se verificar que o anel fenólico está presente nas duas estruturas, o qual é responsável pelo encaixe no sítio receptor, podendo, portanto, elucidar atividade estrogênica.

2.1.3. Mecanismos de Ação dos Desreguladores Endócrinos

Os hormônios após serem sintetizados são transportados pela corrente sanguínea até os órgãos onde são utilizados. As células possuem um receptor de hormônio e ao hormônio ligar-se ao receptor, a resposta desejada é produzida. A desregulação endócrina pode ocorrer quando os desreguladores endócrinos interagem com os receptores de hormônio, alterando a resposta padrão do sistema endócrino (Birkett e Lester, 2003).

Na Figura 2.1 são ilustrados dois mecanismos de atuação dos desreguladores endócrinos. Na Tabela 2.7 são apresentados vários mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos. A ação pode ocorrer por meio de bloqueio, pela mimetização, estimulação ou inibição da produção dos hormônios naturais.

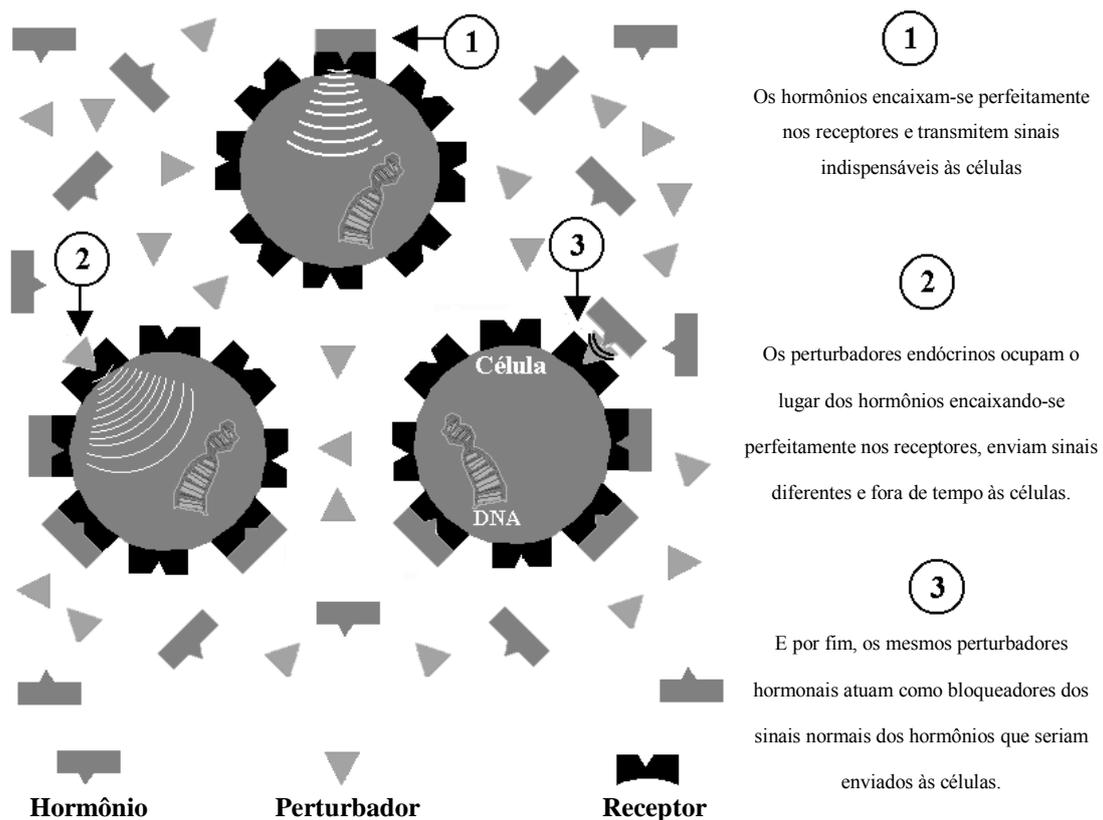


Figura 2.1. Mecanismo de atuação dos desreguladores endócrinos (Bila, 2005).

Tabela 2.7. Diferentes mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.

Mecanismo de Ação	Definição
Mimetizar	Um desregulador endócrino pode ligar-se ao receptor de um hormônio e enviar mensagens aos genes receptores. Mensagens enviadas no momento impróprio ou superprodução de mensagens têm efeitos adversos em funções biológicas.
Simular	Alguns desreguladores endócrinos são capazes de simular a formação de mais receptores de hormônios nas células, levando a amplificação de sinais.
Bloquear	Pela ocupação do receptor na célula, alguns desreguladores endócrinos são capazes de bloquear o hormônio natural, impedindo que sua função seja exercida. Isso pode aumentar ou diminuir o efeito dependendo se o bloqueador é mais ou menos potente do que o hormônio que está sendo bloqueado.
Destruir	Podem destruir o hormônio ou a capacidade do hormônio de executar a sua função, alterando sua estrutura direta ou indiretamente, fazendo com que o hormônio não se encaixe no sítio receptor.

Fonte: Birkett e Lester (2003).

2.1.4. Ocorrência de Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente

O monitoramento de desreguladores endócrinos no meio ambiente tem sido largamente estudado por meio de trabalhos realizados em diversos países. Essas substâncias são encontradas em afluentes e efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), lodo biológico das ETE, em sedimentos marinhos e solos e nas águas superficiais, subterrâneas e potáveis.

A contaminação de solo por estrogênios pode ser causada pela aplicação de lodo (de estações de tratamento de esgoto) tratado por digestão anaeróbia em solos para agricultura. Ternes *et al.* (2002) avaliaram a ocorrência de estrogênios no lodo ativado e

no lodo tratado por digestão anaeróbia. Os resultados mostraram que estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol foram detectados em concentrações acima de 37 ng g⁻¹, 49 ng g⁻¹ e 17 ng g⁻¹, respectivamente. A ocorrência de estrogênios no lodo estabilizado indicou que os estrogênios são persistentes ao processo de digestão.

As águas subterrâneas, fonte de águas potáveis, podem ser contaminadas pela infiltração de substâncias químicas através do solo. As águas subterrâneas normalmente não requerem muitos estágios de tratamento. Frequentemente, essas águas são sujeitas apenas às etapas de desinfecção (com cloro, por exemplo). Conseqüentemente, há um grande risco de que desreguladores endócrinos possam estar presentes em águas potáveis derivadas de águas subterrâneas (Huber *et al.*, 2005).

17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol são encontrados em amostras de água potável em concentrações de até 2,1 ng l⁻¹ e 0,5 ng l⁻¹, respectivamente (Bodzek e Dudziak, 2006). Na Figura 2.2 tem-se um esquema que mostra como ocorre a contaminação das águas pelos hormônios enquanto que na Tabela 2.8 são apresentadas algumas fontes de desreguladores endócrinos e na Tabela 2.9 fontes de hormônios.

Tabela 2.8. Fontes de alguns desreguladores endócrinos.

Fonte	Desreguladores Presentes
Esgoto Doméstico	Esteróides estrogênicos, surfactantes, bisfenol A
Efluente Industrial	Surfactantes, hidrocarbonetos poliaromáticos, bifenilas policloradas, pesticidas, bisfenol A
Cultivo (Agricultura)	Pesticidas, éter difenil polibromado, hidrocarbonetos poliaromáticos
Animais	Esteróides estrogênicos

Fonte: Birkett e Lester (2003).

Tabela 2.9. Algumas fontes de hormônios.

Fonte	Hormônios
Alimentos – carne, peixes, ovos, carne de porco e derivados do leite	17 β -estradiol, estrona, progesterona, testosterona
Efluentes de plantas de tratamento de efluentes	17 β -estradiol, estrona, estriol, 17 α -etinilestradiol
Lodo de estação de tratamento de esgoto	17 β -estradiol, estrona, estriol, 17 α -etinilestradiol
Pílulas anticoncepcionais	17 α -etinilestradiol, mestranol
Reposição hormonal	Estrona conjugada, 17 α e 17 β -estradiol
Resíduos agrícolas	17 β -estradiol, estrona

Fonte: Birkett e Lester (2003).

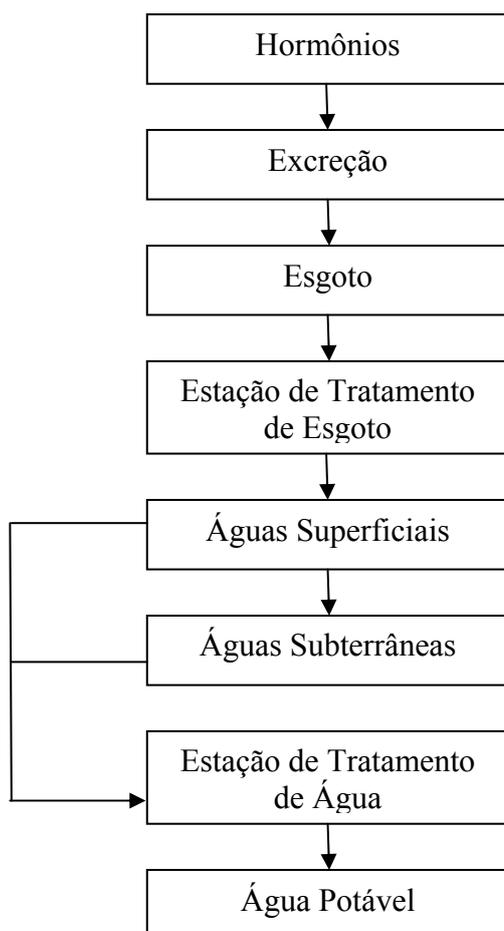


Figura 2.2. Esquema da contaminação das águas pelos hormônios (Stumpf *et al.*, 1999).

Efluentes industriais e municipais, assim como rejeitos agrícolas são as principais fontes de substâncias endócrinas descartadas no ambiente aquático (Boyd *et al.*, 2003; Snyder *et al.*, 1999; Desbrow *et al.*, 1998). O Departamento de Pesquisa Geológica dos Estados Unidos (U. S. Geological Survey – USGS) informou que alguns dos contaminantes orgânicos que prevalecem em águas superficiais nos Estados Unidos são detergentes e fármacos, incluindo hormônios sintéticos potentes como 17 α -etinilestradiol, e hormônios naturais como 17 β -estradiol (Kolpin *et al.*, 2002).

A concentração média de 17 α -etinilestradiol em efluentes domésticos na Alemanha, Inglaterra, Holanda e Estados Unidos, obtida por vários autores (Adler *et al.*, 2001 (apud Heberer, 2002); Xiao *et al.*, 2001; Kuch e Ballschmiter, 2001; Johnson *et al.*, 2000; Belfroid *et al.*, 1999; Ternes *et al.*, 1999a; Desbrow *et al.*, 1998), esteve na faixa de 1 a 3 ng l⁻¹ aproximadamente ou abaixo do limite de detecção. Embora as concentrações encontradas sejam bastante baixas, elas são de extrema importância para o ambiente aquático uma vez que estudos de testes de atividade estrogênica *in vitro* mostraram que a exposição de peixes a uma concentração de somente 0,1 ng l⁻¹ de 17 α -etinilestradiol pode provocar a feminização de machos de algumas espécies (Purdom *et al.*, 1994).

Johnson e Sumpter (2001) verificaram que a conversão biológica de 17 β -estradiol para estrona pode explicar a alta concentração de estrona encontrada em amostras de efluentes de estações de tratamento de esgoto.

Nas Tabelas 2.10 e 2.11 são mostradas algumas ocorrências de estrogênios no meio ambiente. A detecção e obtenção da concentração de estrogênios em águas superficiais e afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto são processos trabalhosos e dispendiosos.

Tabela 2.10. Ocorrência de estrogênios em estações de tratamento de esgoto.

Local	Estrogênios	Referência
ETE - Japão	Estrona (afluente/efluente): 20,0 ng l ⁻¹ / 2,3 ng l ⁻¹ 17β-estradiol (afluente/efluente): 9,2 ng l ⁻¹ / <0,5 ng l ⁻¹ Estriol (afluente/efluente): 120,0 ng l ⁻¹ / 1,0 ng l ⁻¹	Hashimoto <i>et al.</i> (2007)
ETE - Canadá	17β-estradiol (afluente/efluente): 9 ng l ⁻¹ / 2 ng l ⁻¹ Estrona (afluente/efluente): 16 ng l ⁻¹ / 5 ng l ⁻¹	Lee <i>et al.</i> (2005)
ETE – Reino Unido	17β-estradiol (afluente): 182,7 ng l ⁻¹ Estrona (afluente): 81 ng l ⁻¹	Jiang <i>et al.</i> (2005)
ETE - EUA	17β-estradiol (afluente/efluente): 18,9-71,2 ng l ⁻¹ / 6,5-53,1 ng l ⁻¹	Dorabawila e Gupta (2005)
ETE - Canadá	17β-estradiol (afluente/efluente): 15,6 ng l ⁻¹ / 1,8 ng l ⁻¹ Estrona (afluente/efluente): 49 ng l ⁻¹ / 17 ng l ⁻¹	Servos <i>et al.</i> (2005)
ETE - Noruega, Suécia, Finlândia, Países Baixos, Bélgica, Alemanha, França e Suíça	Estrona (efluente): 3,0 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (efluente): 1,1 ng l ⁻¹	Johnson <i>et al.</i> (2005)
ETE - Itália	17α-etinilestradiol (afluente): < 1,6 ng l ⁻¹	Laganà <i>et al.</i> (2004)
ETE - Alemanha	17β-estradiol (efluente): 5,6 ng l ⁻¹ Estrona (efluente): 19,0 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (efluente): 1,5 ng l ⁻¹	Pawlowski <i>et al.</i> (2004)
ETE - França	Estrona (afluente/efluente): 9,6-17,6 ng l ⁻¹ / 4,3-7,2 ng l ⁻¹ 17β-estradiol (afluente/efluente): 11,1-17,4 ng l ⁻¹ / 4,5-8,6 ng l ⁻¹ Estriol (afluente/efluente): 11,4-15,2 ng l ⁻¹ / 5,0-7,3 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (afluente/efluente): 4,9-7,1 ng l ⁻¹ / 2,7-4,5 ng l ⁻¹	Cargouët <i>et al.</i> (2004)

Continuação da Tabela 2.10. Ocorrência de estrogênios em estações de tratamento de esgoto.

Local	Estrogênios	Referência
ETE – Inglaterra	Estrona (efluente): 6,4-29 ng l ⁻¹ 17β-estradiol (efluente): 1,6-7,4 ng l ⁻¹ Estriol (efluente): 2,0-4,0 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol: não detectado	Xiao <i>et al.</i> (2001)
ETE - Alemanha	Estrona (efluente): 0,35-18,0 ng l ⁻¹ 17β-estradiol (efluente): 0,15-5,2 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (efluente): 0,1-8,9 ng l ⁻¹	Kuch e Ballschmitter (2001)
ETE – Itália	Estriol (afluente/efluente): 57 ng l ⁻¹ / 10 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (afluente): < 10 ng l ⁻¹	Johnson <i>et al.</i> (2000)
ETE - Itália	Estrona (afluente): 52 ng l ⁻¹ 17β-estradiol (afluente/efluente): 12 ng l ⁻¹ /1 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (afluente/efluente): 3,0 ng l ⁻¹ / 0,4 ng l ⁻¹ Estriol (afluente): 80 ng l ⁻¹	Baronti <i>et al.</i> (2000)
ETE - Holanda	Estrona (efluente): 47 ng l ⁻¹ 17β-estradiol (efluente): 1-12 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol: 0,45 ng l ⁻¹	Belfroid <i>et al.</i> (1999)
ETE- Canadá	17α-etinilestradiol (efluente): 9 ng l ⁻¹	Ternes <i>et al.</i> (1999a)
ETE – Brasil	17β-estradiol (afluente): 21 ng l ⁻¹ Estrona (afluente): 40 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (afluente): 6 ng l ⁻¹	Ternes <i>et al.</i> (1999b)
ETE – Alemanha	17β-estradiol (afluente): 15 ng l ⁻¹ Estrona (afluente): 27 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (afluente): 1,4 ng l ⁻¹	Ternes <i>et al.</i> (1999b)

Continuação da Tabela 2.10. Ocorrência de estrogênios em estações de tratamento de esgoto.

Local	Estrogênios	Referência
ETE – Reino Unido	Estrona (efluente): 1,4-76,0 ng l ⁻¹ 17β-estradiol (efluente): 2,7-48,0 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (efluente): 7,0 ng l ⁻¹ (máxima)	Desbrow <i>et al.</i> (1998)

Tabela 2.11. Ocorrência de estrogênios em águas superficiais e subterrâneas.

Local	Estrogênios	Referência
Água Superficial - EUA	17β-estradiol: 0,83 ng l ⁻¹ Estrona: 1,2 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol: 4,7 ng l ⁻¹	Zuo <i>et al.</i> (2006)
Águas Superficiais - EUA	17β-estradiol: 1,9-6,0 ng l ⁻¹	Dorabawila e Gupta (2005)
Águas Superficiais - Itália	17α-etinilestradiol: < 1 ng l ⁻¹	Laganà <i>et al.</i> (2004)
Águas superficiais França	Estrona: 1,1-3,0 ng l ⁻¹ 17β-estradiol: 1,4-3,0 ng l ⁻¹ Estriol: 1,0-2,5 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol: 1,1-2,9 ng l ⁻¹	Cargouët <i>et al.</i> (2004)
Águas superficiais e subterrâneas – Áustria	Águas Superficiais: 17β-estradiol (máxima/média): 1,2 ng l ⁻¹ / 0,13 ng l ⁻¹ Estrona (máxima/média): 4,6 ng l ⁻¹ / 0,35 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol (máxima): 0,33 ng l ⁻¹ Águas Subterrâneas: 17β-estradiol (máxima/média): 0,79 ng l ⁻¹ / 0,07 ng l ⁻¹ Estrona (máxima): 1,6 ng l ⁻¹	Hohenblum <i>et al.</i> (2004)
Águas Superficiais - Japão	Estrona: 0,2-6,6 ng l ⁻¹ 17β-estradiol: < 0,3-1,0 ng l ⁻¹ 17α-etinilestradiol: não detectado	Isobe <i>et al.</i> (2003)

Continuação da Tabela 2.11. Ocorrência de estrogênios em estações de tratamento de esgoto.

Local	Estrogênios	Referência
Águas Superficiais - Estados Unidos	17 α -etinilestradiol: 1 ng l ⁻¹ 17 β -estradiol: 0,2 ng l ⁻¹	Kolpin <i>et al.</i> (2002)
Águas Subterrâneas - Alemanha	17 α -etinilestradiol: 2,4 ng l ⁻¹ (máxima)	Adler <i>et al.</i> (2001) - apud Heberer (2002)
Águas Superficiais - Inglaterra	Estrona: 0,2-17 ng l ⁻¹ 17 β -estradiol: 0,5-7 ng l ⁻¹ Estriol: 1,2-3,1 ng l ⁻¹ 17 α -etinilestradiol: não detectado	Xiao <i>et al.</i> (2001)
Águas Superficiais e Água Potável – Alemanha	Águas Superficiais: Estrona: 0,10-4,1 ng l ⁻¹ 17 β -estradiol: 0,15-3,6 ng l ⁻¹ 17 α -etinilestradiol: 0,10-5,1 ng l ⁻¹ Água Potável: Estrona: 0,20-0,60 ng l ⁻¹ 17 β -estradiol: 0,20-2,1 ng l ⁻¹ 17 α -etinilestradiol: 0,15-0,50 ng l ⁻¹	Kuch e Ballschmitter (2001)
Águas Superficiais - Roma, Itália	Estrona: 1,5 ng l ⁻¹ 17 β -estradiol: 0,11 ng l ⁻¹ 17 α -etinilestradiol: 0,04 ng l ⁻¹ Estriol: 0,33 ng l ⁻¹	Baronti <i>et al.</i> (2000)
Águas superficiais Holanda	Concentrações de hormônios: < 5 ng l ⁻¹	Belfroid <i>et al.</i> (1999)

2.1.5. Efeitos Provocados pelos Desreguladores Endócrinos

É difícil explicar, simplesmente com base na estrogenicidade de compostos estrogênicos avaliados separadamente, os possíveis efeitos dessas substâncias à saúde humana e à vida animal. Na verdade, populações humanas são expostas a misturas de estrogênios, sendo que esses contaminantes ambientais podem interagir entre si de modo a aumentar a estrogenicidade total de uma matriz ambiental (Kortenkamp e Altenburger, 1998).

O tempo e, principalmente, o período em que o desregulador endócrino age sobre um organismo pode ser decisivo. Durante os primeiros estágios de vida, o desenvolvimento dos órgãos sexuais é controlado por hormônios sexuais. Portanto, quando a desregulação endócrina ocorre durante os estágios iniciais de desenvolvimento, pode resultar em defeitos permanentes ou disfunção de órgãos. Por outro lado, em um organismo maduro, os hormônios estimulam ou inibem funções de órgãos, estando também envolvidos na formação de esperma e no ciclo feminino. Nessa etapa, os efeitos são reversíveis e podem ser cessados quando o desregulador não estiver presente.

2.1.5.1. Efeitos na Saúde Humana

Possivelmente, o desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, de útero e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento de incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas tireóides, distúrbios nas funções do ovário (crescimento folicular e a ovulação), na fertilização e gravidez e efeitos neurocomportamentais podem ser induzidos por desreguladores endócrinos. Trabalhos publicados na literatura relatam que a exposição a estrogênios é o principal fator de risco para o desenvolvimento de endometriose (Coleman *et al.*, 2005; Solomon e Schettler, 2000; Gray Jr., 1998; U.S. Environmental Protection Agency, 1997; Daston *et al.*, 1997).

Os primeiros efeitos relacionados à contaminação por desreguladores endócrinos foram observados em 1940 quando aviadores que controlavam ou aplicavam DDT apresentaram redução no número de espermatozoides (Singer, 1949; apud Waring e Harris, 2005).

Muitos estudos têm revelado que, nos últimos 60 anos, a contagem média de espermatozoides em alguns países diminuiu pela metade e dobrou a incidência de malformações do sistema reprodutivo masculino, como hipospadias. A exposição de homens adultos a substâncias estrogênicas pode resultar em ginecomastia (crescimento das mamas) e interferência no funcionamento do sistema glandular associado ao hipotálamo-hipófise-gônadas, resultando em diminuição da libido, impotência, diminuição dos níveis de androgênios no sangue e diminuição na contagem de espermatozoides (Waring e Harris, 2005).

Os desreguladores endócrinos provocam alteração do nível de hormônio da tireóide, provocando alterações no crescimento e desenvolvimento de humanos (U.S. Environmental Protection Agency, 1997; Harrison *et al.*, 1997). Relatos mostram que os estrogênios naturais (17β -estradiol) e os sintéticos não afetam somente o sistema reprodutivo, mas também influenciam o sistema imunológico (Ahmed, 2000).

Em humanos, os hormônios esteróides (androgênios e estrogênios) regulam o processo de desenvolvimento fetal, como a diferenciação sexual. Androgênios, incluindo a testosterona, regulam o desenvolvimento do fenótipo masculino e um distúrbio no nível de esteróide pode causar feminização de fetos masculinos, caso exista um excesso de compostos estrogênicos ou uma deficiência de androgênios. Por outro lado, fetos femininos podem se tornar masculinizados devido ao excesso de androgênio ou pela falta de estrogênio durante o período de diferenciação sexual do feto (Waring e Harris, 2005).

Mulheres que engravidam enquanto tomam anticoncepcionais, como o 17α -etinilestradiol, podem gerar bebês com risco de desenvolvimento de doenças de próstata quando adultos. Existem outros problemas clínicos que podem ser causados por estrogênios durante a gravidez: malformações genitais e infertilidade. Os estrogênios afetam o desenvolvimento, podendo causar malformação da genitália e dos órgãos reprodutivos. Altos níveis de exposição prejudicam a gravidez, podendo levar ao aborto espontâneo, dependendo da espécie (Daston *et al.*, 1997).

2.1.5.2. Efeitos na Vida Animal

Investigações vêm sendo realizadas em laboratórios e em campo para avaliar os efeitos de certos compostos químicos na função endócrina de invertebrados, peixes, répteis, pássaros e mamíferos (Harrison *et al.*, 1997). Pelos resultados desses estudos, compostos naturais e sintéticos têm potencial para desregular a reprodução e o desenvolvimento de animais. Esses compostos podem induzir irreversivelmente características sexuais femininas em peixes machos (Gray Jr., 1998), podendo levar a esterilização ou redução da reprodução.

Devido aos desreguladores endócrinos fornecerem uma variedade de respostas hormonais e efeitos adversos na reprodução e desenvolvimento de organismos, sugere-se que esses compostos possam provocar impactos em outros níveis da população, em outras espécies ou em outros ecossistemas (U.S. Environmental Protection Agency, 1997).

No ambiente aquático, a exposição de organismos a desreguladores endócrinos está relacionada a efeitos endócrinos em peixes machos como indução de vitelogenina e feminização dos órgãos reprodutivos (Sumpter, 1998; Tyler *et al.*, 1998; Routeledge *et al.*, 1998; Purdom *et al.*, 1994). Vitelogenina é uma lipoproteína que, em circunstâncias normais, somente é detectável no plasma sanguíneo de peixes fêmeas adultos (Nogueira, 2003).

Estudos realizados por Harries *et al.* (1997) mostraram que, quando trutas (*Oncorhynchus mykiss*) foram mantidas em gaiolas perto de descargas de uma estação de tratamento de efluentes, foi observada a síntese de vitelogenina em machos. Níveis elevados de vitelogenina e diminuição do nível de testosterona foram verificados por Folmar *et al.* (1996) em carpas macho (*Cyprinus carpio*) que viviam próximas a regiões de descarte de efluentes. Aumento do nível de vitelogenina, feminização de machos e presença simultânea de gônadas masculinas e femininas (hermafrodita) foram observados em peixes (*Rutilus rutilus*) submetidos a efluentes de estações de tratamento de esgoto (Jobling *et al.*, 1998). Dentre uma amostra de peixes de uma bacia receptora de descarte de efluentes, aproximadamente 70 % dos peixes eram fêmeas (Hansen *et al.*, 1998).

Trabalhos encontrados na literatura mostram que uma concentração de 0,1 ng l⁻¹ de 17 α -etinilestradiol induz a expressão da vitelogenina em peixes (Purdom *et al.*, 1994), que a faixa de concentração de 0,1 a 15 ng l⁻¹ pode afetar a diferenciação sexual e que a faixa de concentração de 2 a 10 ng l⁻¹ pode afetar negativamente a fecundidade. Uma longa exposição a uma concentração de 5 ng l⁻¹ leva a uma redução significativa na fecundidade dos descendentes (Nash *et al.*, 2004). Dessa forma, a concentração de 17 α -etinilestradiol encontrada no meio ambiente (entre 0,5 e 7 ng l⁻¹, Bila e Dezotti, 2003) representa uma significativa contribuição para a disfunção no sistema reprodutivo de peixes (Fent *et al.*, 2006).

Estudos *in vivo* mostraram que a exposição de peixes a concentrações de 1 a 10 ng l⁻¹ de 17 β -estradiol e 0,1 ng l⁻¹ de etinilestradiol provocaram feminização de algumas espécies de peixes (Routledge *et al.*, 1998). As fêmeas do peixe *Japanese medaka* apresentaram menor fecundidade quando expostas a 17 β -estradiol. Os estrogênios não induzem efeitos adversos somente em animais, mas também interferem no crescimento e desenvolvimento de plantas (Lai *et al.*, 2002).

A partir dos efeitos provocados pelos desreguladores endócrinos em animais e humanos e da ocorrência dessas substâncias em águas superficiais e subterrâneas, verifica-se a necessidade de estudos relativos a métodos de determinação e degradação dessas substâncias.

2.1.6. Determinação de Desreguladores Endócrinos

Há uma variedade de métodos disponíveis para a determinação dos desreguladores endócrinos. Se o objetivo for identificar e quantificar compostos particulares que estão presentes em uma matriz aquosa, a análise química é mais apropriada. Dentre as análises químicas, têm-se a cromatografia gasosa e a líquida associadas à espectrometria de massas.

Entretanto, se o objetivo é avaliar um composto particular ou uma mistura de compostos que exibem atividade de desregulador endócrino, há uma variedade de testes

in vitro e *in vivo*. Esses testes são bastante indicados quando se deseja verificar o potencial estrogênico de um efluente descartado no meio ambiente ou de uma amostra de água superficial.

2.1.6.1. Determinação por Análises Químicas

A determinação de hormônios no ambiente constitui-se em tarefa difícil, devido à complexidade das matrizes ambientais e a sua baixa concentração (na ordem de ng l^{-1}), porém fisiologicamente ativa (Reis Filho *et al.*, 2006). O uso de técnicas químicas permite a determinação desses compostos estrogênicos no meio ambiente.

Os métodos descritos na literatura para detecção de desreguladores em ambiente aquático na faixa de $\mu\text{g l}^{-1}$ e ng l^{-1} são baseados na extração, em alguns casos derivatização do hidrogênio ácido e determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM) (Hernando *et al.*, 2004; Brossa *et al.*, 2002).

2.1.6.1.1. Extração

Os desreguladores endócrinos estão geralmente presentes no ambiente em baixas concentrações. Diante disso, uma técnica de pré-concentração é geralmente necessária para a determinação desses compostos. Existem diferentes técnicas para a extração de contaminantes presentes em amostras ambientais: extração líquido - líquido, destilação a vapor, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, ultra-sonificação, extração com fluido supercrítico, entre outras (Jeannot *et al.*, 2002). Dentre essas técnicas, a extração em fase sólida é a mais comumente empregada (Brossa *et al.*, 2002).

A aceitação rápida e cada vez mais abrangente da extração em fase sólida (EFS) reside no fato que esta técnica permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e pré-purificação. A EFS é uma técnica de extração simples, rápida e que requer pequena quantidade de solvente para a posterior extração da amostra. A extração em fase sólida implica na percolação da amostra através do

adsorvente, quando componentes da amostra são eluídos e os analitos ficam retidos. Em seguida, os analitos são eluídos com solvente apropriado (Aquino Neto, 2003).

Freqüentemente, são utilizados cartuchos de extração comercialmente disponíveis, com uma variedade de adsorventes tais como, C₁₈ (Octadesilsilano - grupamento apolar com a estrutura -Si-(CH₂)₁₇-CH₃) (Johnson *et al.*, 2005; Servos *et al.*, 2005; Cargouët *et al.*, 2004; Johnson e Sumpter, 2001), Oasis HLB (Laganà *et al.*, 2004), SDB-XC (Belfroid *et al.*, 1999) e C₄ (Baronti *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2000).

2.1.6.1.2. Derivatização

A alta massa molecular e a presença de grupos polares nas moléculas de compostos esteróides são propriedades que tornam a análise direta por cromatografia gasosa dessas substâncias bastante difícil, uma vez que essas moléculas não são estáveis sob condições de cromatografia gasosa.

Portanto, muitas substâncias devem ser derivatizadas antes da análise por cromatografia gasosa, com o objetivo de facilitar a determinação desses compostos. A cromatografia gasosa é limitada ao uso para compostos que são voláteis. Dessa forma, por meio da derivatização, é possível superar a limitação da volatilidade e estabilidade (Birkett e Lester, 2002).

Na derivatização de amostras contendo desreguladores endócrinos normalmente são empregados derivatizantes como MTBFA (N-metil-N-terc-butildimetilsilil-trifluoroacetamida), MSTFA/TMSI/DTE (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida/trimetilsililimidazola/ditioeritrol), BSTFA (N, O – bistrimetilsililtrifluoroacetamida), PFB-TMS (pentafluorobenzil-trimetilsilil), MTBSTFA (N-metil-N-(terc-butildimetiltrifluoroacetamida)), PFPA (ácido pentafluoropropiônico) e PFBBR-TMS (pentafluorobenzilbromado-trimetilsilil).

Dentre os derivatizantes, o BSTFA é largamente utilizado na determinação de compostos estrogênicos devido à alta reatividade desse reagente com compostos que contém grupos hidroxila, sua alta volatilidade resulta em não coeluição dos picos iniciais, possui baixa degradação térmica e boa solubilidade em solventes orgânicos comuns (Hernando *et al.*, 2004).

A silanização é a técnica mais utilizada para derivatização de amostras para análise de cromatografia gasosa. Na silanização, um hidrogênio ativo é substituído por um grupo alquilsilil, como o grupo trimetilsilil (TMS) ou *t*-butildimetilsilil (*t*-BDMS). Comparado com os compostos de origem, os derivados silanizados são mais voláteis, menos polares e mais estáveis termicamente.

A cromatografia líquida vem sendo largamente empregada na análise de esteróides estrogênicos, uma vez que não é necessária a derivatização das substâncias. Uma revisão dos métodos analíticos encontrados na literatura para determinação de estrogênios no ambiente foi realizada por Wang *et al.* (2008): cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta performance (CLAE), CG e CLAE com espectrometria de massas (EM). Na Tabela 2.12 têm-se alguns métodos utilizados na determinação de compostos estrogênicos em efluentes e águas.

Tabela 2.12. Métodos utilizados na determinação de estrogênios em amostras de água e efluentes.

Amostra	Estrogênios	Volume da Amostra	Extração	Separação/ Determinação	Limite de detecção (ng l⁻¹)	Recuperação (%)	Referências
Afluente e Efluente de ETE	E ₁ , E ₂ , E ₃	1 l	EFS (Oasis HLB)	CG/EM	-	79,5–120	Tan <i>et al.</i> (2007)
Água	E ₁ , E ₂ , E ₃ e EE ₂	500 ml	EFS (LiChrolut RP-18)	CL/EM	2,5–5	91–100	Rodriguez-Mozaz <i>et al.</i> (2004)
Efluente de ETE	E ₁ , E ₂ , E ₃	100 – 250 ml	EFS (Carbograph-4)	CLAE/EM	0,5 – 2	87–91	D’Ascenzo <i>et al.</i> (2003)
Água Superficial e Efluente	E ₁ , E ₂ , E ₃ e EE ₂	250 ml – 1 l	EFS - Oasis HLB ou C ₁₈	CG/EM	2 – 10	82–109	Jeannot <i>et al.</i> (2002)
Água Superficial	E ₁ , E ₂ , E ₃ e EE ₂	200 ml	EFS - Excelpak SPE ENV/124	CG/EM	0,10 – 0,28	87,3–126,5	Nakamura <i>et al.</i> (2001)

Continuação da Tabela 2.12. Métodos utilizados na determinação de estrogênios em amostras de água e efluentes.

Amostra	Estrogênios	Volume da Amostra	Extração	Separação/ Determinação	Limite de detecção (ng l ⁻¹)	Recuperação (%)	Referências
Efluente	E ₁ , E ₂ , E ₃ e EE ₂	2,5 l	EFS (C ₁₈) seguida da derivatização com cloreto de pentafluorbenzoila	CG/EM IQ/EM	0,2	84-116	Xiao <i>et al.</i> (2001)
Efluente	E ₁ , E ₂ , E ₃ e EE ₂	200 ml	EFS (PLRPS/C ₁₈)	CLAE EM	2-500	57-112	López de Alda e Barceló (2001)
Efluente	E ₁ , E ₂ , E ₃ e EE ₂	1 l	Cartuchos de EFS de carbono preto grafitizados	CLAE/EM/EM	1,0	84-95	Laganà <i>et al.</i> (2000)
Água	E ₁ , E ₂ , EE ₂	2,5 l	EFS (discos de C ₁₈)	CG/EM CG/EM/EM	1,0	92-99,6	Kelly (2000)
Afluente e Efluente	E ₁ , E ₂ , E ₃ e EE ₂	0,5-1,0 l	EFS (Carbograph-4)	CLAE/EM/EM	0,2-0,5	88-97	Johnson <i>et al.</i> (2000)
Afluente e Efluente	E ₁ , E ₂ , E ₃ , EE ₂	1 L	EFS (LiChrolut-EN/C ₁₈)	CG/EM/EM		77-90	Ternes <i>et al.</i> (1999b)

Continuação da Tabela 2.12. Métodos utilizados na determinação de estrogênios em amostras de água e efluentes.

Amostra	Estrogênios	Volume da Amostra	Extração	Separação/ Determinação	Limite de detecção (ng l ⁻¹)	Recuperação (%)	Referências
Efluente	E ₁ , E ₂ e EE ₂	15 l	EFS	CG/EM	0,5-2	-	Larsson <i>et al.</i> (1999)
Águas Superficiais e Efluente	E ₁ , E ₂ e EE ₂	1 l	EFS (SDB-XC)	CG/EM/EM	0,1-2,4	88-98	Belfroid <i>et al.</i> (1999)
Efluente	E ₁ , E ₂ e EE ₂	20 l	EFS (C ₁₈)	CG/EM	0,2	79-85	Desbrow <i>et al.</i> (1998)

E₁ – estrona

E₂ – 17β-estradiol

E₃ – estriol

EE₂ – 17α-etinilestradiol

EFS – extração em fase sólida

PLRPS – Copolímero de estireno-divinilbenzeno

SDB-XC – disco de poliestireno divinilbenzeno

CG – cromatografia gasosa

CLAE – cromatografia líquida de alta performance

EM – espectrometria de massas

EM/EM – Dois espectrômetros de massa em série

IQ/EM – Espectrometria de massa por ionização química

2.1.6.2. Determinação da Atividade Estrogênica por Ensaios *In Vivo* e *In Vitro*

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) desenvolveu um Programa de Avaliação de Desreguladores Endócrinos (EDSP), com o objetivo de estabelecer testes para identificar substâncias estrogênicas (Snyder *et al.*, 2003). O mesmo vem sendo realizado pela Organização Europeia (OECD) para o desenvolvimento de métodos para identificar essas substâncias. Entretanto, não há consenso entre os pesquisadores com relação à escolha do melhor método de determinação de atividade estrogênica de desreguladores endócrinos presentes no ambiente aquático (Kim *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007).

A atividade estrogênica é definida, segundo Daston *et al.* (1997), como a capacidade de produção de respostas biológicas qualitativamente similares àquelas produzidas pelos hormônios endógenos, como o 17 β -estradiol. A atividade estrogênica de uma substância pode estar associada à sua estrutura química. A presença de um grupamento polar capaz de fazer ponte de hidrogênio (como exemplo, a hidroxila) em um sistema aromático pode ser importante para a atividade estrogênica (Hamblen *et al.*, 2003). Até o momento foi desenvolvida uma variedade de ensaios *in vivo* e *in vitro*, com o objetivo de avaliar a estrogenicidade de substâncias.

Os ensaios *in vivo* avaliam vários parâmetros, como massa de órgãos sexuais, diferenciação celular, expressão de proteínas e atividade enzimática (Gray Jr. *et al.*, 1997; Baker, 2001). Os ensaios *in vitro* são baseados em mecanismos de ação que elucidam respostas e utilizam pontos mais definidos do que os ensaios *in vivo*. Dentre os ensaios *in vitro* podem ser citados os que avaliam a interação com receptores hormonais e a proliferação celular, tais como o ensaio YES e o MCF-7, respectivamente.

Os ensaios *in vivo* utilizados para avaliação da estrogenicidade apresentam como vantagens explicações para os mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Andersen *et al.*, 1999; Shelby *et al.*, 1996). Apesar de serem largamente utilizados, geralmente são inadequados para avaliação em larga escala, uma vez que são de alto custo, mais trabalhosos e requerem mais tempo para análise, em relação aos ensaios *in vitro* (Zacharewski, 1997).

Os ensaios *in vitro* apresentam algumas vantagens tais como: sensibilidade a baixas concentrações, respostas específicas, custo baixo, requer pouca quantidade de

amostra e pode ser usado para misturas complexas como, por exemplo, águas naturais, efluentes de estações de tratamento de esgoto e efluentes industriais (Körner *et al.*, 1998). Esses ensaios, devido ao fato de apresentarem custos menores e por razões éticas, vêm sendo utilizados como alternativa aos testes *in vivo* para a análise de amostras ambientais.

2.1.6.2.1. Ensaios *In Vivo*

Dentre os ensaios *in vivo*, o mais frequentemente utilizado no ambiente aquático é o ensaio que avalia o nível de vitelogenina no plasma de peixes (Gutendorf e Westendorf, 2001; Purdom *et al.*, 1994). O gene da vitelogenina está presente em peixes fêmeas e machos. Entretanto, em organismos machos, sob condições normais não é expresso, possivelmente devido à baixa concentração de estrogênio no plasma. O aumento da concentração de vitelogenina no plasma é um indicativo da presença de substâncias com atividade estrogênica (Folmar *et al.*, 2000; Folmar *et al.*, 1996; Sumpter e Jobling, 1995; Korach e McLachlan, 1995).

Outros ensaios utilizados são: ensaio uterotrófico (alteração da massa uterina em roedores (Odum *et al.*, 1997)) e ensaio de cornificação da mucosa vaginal em roedores (Baker, 2001). Entretanto, ensaios com roedores não são utilizados em larga escala no ambiente devido ao custo, complexidade e preocupações com questões éticas (Soto *et al.*, 1995).

Os testes *in vivo* são necessários para a avaliação dos impactos dos desreguladores endócrinos como um todo, uma vez que esses testes avaliam reprodução e desenvolvimento em animais. Entretanto, não são utilizados para o monitoramento do meio ambiente devido ao alto custo e alta demanda de tempo (Birkett e Lester, 2002). Na Tabela 2.13 são apresentadas algumas vantagens e desvantagens dos ensaios *in vivo* com roedores e dos ensaios com biomarcadores (nível de vitelogenina).

Tabela 2.13. Vantagens e desvantagens dos ensaios *in vivo*.

Ensaio	Vantagens	Desvantagens
Ensaio com Roedores	- Incorpora todos os aspectos do sistema endócrino, permitindo um estudo da absorção, metabolismo, distribuição e excreção da substância, como também de caminhos alternativos.	- Não são adequados para analisar substâncias em larga escala; - Custo e complexidade altos; - Alto tempo de ensaio; - Problemas éticos com o uso de animais.
Ensaio com biomarcadores (VTG)	- Realizado em curto prazo e baixo custo; - Resposta direta e facilmente medida.	

Fonte: Bila (2005).

2.1.6.2.2. Ensaios *In Vitro*

Para determinar o potencial estrogênico de amostras ambientais, como águas, efluentes e sedimentos, e de substâncias químicas, utiliza-se uma variedade de bioensaios *in vitro* (Andersen *et al.*, 1999; Desbrow *et al.*, 1998; Coldham *et al.*, 1997; Shelby *et al.*, 1996; Routledge e Sumpter, 1996; Arnold *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 1995).

Os principais ensaios utilizados para detecção de desreguladores endócrinos são: (1) ensaios de interação com receptores hormonais (capacidade de uma substância acoplar-se aos receptores hormonais) (Baker, 2001), (2) ensaios de proliferação celular (capacidade de uma substância estimular o crescimento de células sensíveis a estrogênios – exemplo: MCF-7) (Soto *et al.*, 1995) e (3) ensaios de gene repórter em células de mamíferos ou leveduras (capacidade de uma substância estimular a transcrição do gene repórter inseridos nas células) (Gaido *et al.*, 1997; Routledge e Sumpter, 1996).

Routledge e Sumpter (1996) desenvolveram um método de análise *in vitro* utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. A seqüência

de DNA do receptor de estrogênio humano (REh) foi inserida no genoma das leveduras com o objetivo de avaliar compostos com atividade estrogênica. Este ensaio permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de interagir com o receptor de estrogênio humano e elucidar uma resposta estrogênica. O método conhecido por YES (“Yeast Estrogen Screen”) vem sendo largamente empregado devido à rapidez, à reprodutibilidade e à sensibilidade (Silva *et al.*, 2002; Beresford *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2000).

O ensaio MCF-7 baseia-se na proliferação de culturas de células cancerígenas mamárias humanas MCF-7 induzida pela exposição à substância estrogênica. A cultura de células MCF-7 foi derivada de uma paciente com câncer de mama nos anos 1970. O ensaio é baseado em três premissas: (1) fatores presentes no soro adicionado no meio inibem a proliferação das MCF-7, (2) os estrogênios induzem a proliferação das células pela anulação deste efeito inibitório e (3) substâncias não estrogênicas não neutralizam o sinal inibitório presente no soro (Zacharewski, 1997). Nesse ensaio, as células MCF-7 são incubadas de 4 a 6 dias com e sem controle de 17β -estradiol e na presença e ausência da amostra a ser testada. A proliferação das células é determinada pela contagem do número de células ou núcleos (Soto *et al.*, 1995), contudo Körner *et al.* (1998) modificaram a determinação da proliferação das células, utilizando um método colorimétrico.

Os ensaios *in vitro* avaliam a atividade estrogênica total de uma amostra, negligenciando quais compostos são responsáveis por essa atividade. A potência estrogênica de uma substância é comparada com a potência do estrogênio humano 17β -estradiol, que representa o padrão pelo qual a atividade estrogênica é medida (Routledge e Sumpter, 1996).

Os testes *in vitro* são mais viáveis economicamente do que os testes *in vivo*, uma vez que são altamente sensíveis e facilitam a rápida avaliação de um grande número de compostos (Birkett e Lester, 2002). Na Tabela 2.14 são apresentadas algumas vantagens e desvantagens dos ensaios *in vitro*.

Tabela 2.14. Vantagens e desvantagens dos ensaios *in vitro*.

Ensaio	Vantagens	Desvantagens
Ensaio de Ligação Competitiva nos RE	- Ensaios rápidos.	<ul style="list-style-type: none"> - São significativamente menos sensíveis do que outros ensaios <i>in vitro</i>; - Não é um ensaio de fácil automatização, limitando assim sua utilização como ferramenta <i>screening</i>; - Requer uso de aparatos especiais de laboratórios por causa das substâncias radioativas.
Ensaio E-screen	- Ensaio bastante sensível.	<ul style="list-style-type: none"> - Algumas substâncias não-estrogênicas têm influenciado a proliferação em algumas linhagens das células MCF-7; - Variabilidade inter-laboratórios têm sido observada nestes ensaios; - Consumo maior de tempo; - Cultivo mais difícil dos que as células de leveduras; - Mais vulneráveis a riscos de contaminação.
Ensaio YES	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidade; - Produto do gene reporter é excretado no meio não sendo necessária a lise celular; - Células de leveduras são mais resistentes em condições adversas; - Cultivo e manutenção fáceis; - Rápido crescimento celular. 	<ul style="list-style-type: none"> - É menos sensível do que os ensaios com células de mamíferos e o E-screen; - Endpoint colorimétricos (β-galactosidase) tendem a ser menos sensíveis do que para os baseados na luciferase (luminômetro).

Fonte: Bila (2005).

A determinação da atividade estrogênica total de amostras de águas e efluentes pode ser determinada pela concentração equivalente de 17 β -estradiol, obtida por meio de diversos ensaios *in vitro*. A concentração equivalente de 17 β -estradiol é definida como a concentração de 17 β -estradiol que elucida a mesma resposta da amostra analisada.

Sun *et al.* (2008) utilizaram o ensaio YES para avaliar a concentração equivalente de 17 β -estradiol encontrada no afluente e efluente de uma estação de tratamento de esgoto na China. Os resultados mostraram as concentrações equivalentes encontradas no afluente e efluente foram de 15,7 e 10,4 ng l⁻¹, respectivamente. Verificou-se que houve uma pequena degradação dos estrogênios na ETE.

Tan *et al.* (2007) avaliaram a concentração equivalente de 17 β -estradiol presente em cinco estações de tratamento de esgoto municipal na Austrália, utilizando o ensaio E-Screen. A concentração encontrada variou de 108 a 356 ng l⁻¹ no afluente e de abaixo de 1 a 14,8 ng l⁻¹ no efluente, com exceção de uma estação que apresentou 67,8 ng l⁻¹ no efluente. Foi verificado que na maioria das estações, os estrogênios naturais contribuíram com mais de 60 % da atividade estrogênica total.

Salste *et al.* (2007) avaliaram a atividade estrogênica de amostras de efluentes de uma estação de tratamento de esgoto na Finlândia e a concentração equivalente de 17 β -estradiol obtida variou de 4 a 7 ng l⁻¹.

Oh *et al.* (2006) e Oh *et al.* (2000) verificaram que, em águas superficiais da Coreia, a concentração encontrada de equivalente de 17 β -estradiol variou de 0,0005 a 7,4 ng l⁻¹. Na maior estação de tratamento de esgotos da Alemanha a concentração equivalente de estrogênios encontrada no efluente variou de 2,5 a 25 ng l⁻¹ (Körner *et al.*, 2000; Körner *et al.*, 1999).

2.1.7. Atividade Estrogênica

2.1.7.1. Potencial Estrogênico

A maior preocupação relacionada aos desreguladores endócrinos está ligada ao potencial estrogênico dessas substâncias, uma vez que, quanto maior o potencial

estrogênico, maior a capacidade da substância em provocar efeitos adversos em homens e animais. A maioria das substâncias estrogênicas presentes no meio ambiente são consideravelmente menos potentes que o estrogênio natural 17 β -estradiol (Rajapakse *et al.*, 2001). Entretanto, os estrogênios sintéticos são exceções, uma vez que geralmente são mais potentes e mais estáveis em água dos que os estrogênios naturais (Snyder *et al.*, 1999). Portanto, estudos relacionados à remoção de estrogenicidade de hormônios sintéticos e naturais são de extrema importância devido ao alto potencial dessas substâncias.

Um grande número de substâncias não-esteróides, conhecidas como xenoestrogênios são capazes de se ligar ao receptor de estrogênio (RE) e elucidar respostas biológicas. A atividade da maioria dos xenoestrogênios é fraca (potencial relativo a 17 β -estradiol na faixa de 1/1.000 a 1/1.000.000). Estas substâncias interagem com o receptor de estrogênio, uma vez que possuem semelhanças químicas em relação a 17 β -estradiol (normalmente um anel fenólico). A baixa estrogenicidade apresentada pelos xenoestrogênios é resultada, provavelmente, da ausência de perfeita ligação de sua molécula ao receptor de estrogênio (Witorsch, 2002).

Estudos mostram que, normalmente, a potência relativa de substâncias estrogênicas em ensaios *in vitro* não reflete a potência em ensaios *in vivo*, ou seja, as substâncias estrogênicas são mais potentes *in vivo* que *in vitro* (Folmar *et al.*, 2002).

Na Tabela 2.15 são apresentados os potenciais estrogênicos *in vivo* de algumas substâncias (17 β -estradiol (E₂), 17 α -etinilestradiol (EE₂), 4-terc-nonilfenol (NP), 4-terc-octilfenol (OP) e Bisfenol A (BPA)) obtido por diversos pesquisadores.

Tabela 2.15. Comparação do potencial estrogênico *in vivo* de alguns desreguladores endócrinos em termos de indução de vitelogenina.

Organismo testado	E₂	EE₂	NP	OP	BPA	Referência
Peixes (<i>Pimephales promelas</i>)	1	27,7	0,0035	0,00055	0,00016	Brian <i>et al.</i> (2005)
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1	> 4	0,0002	0,00066	0,00002	Van den Belt <i>et al.</i> (2003)
Peixe (<i>Danio rerio</i>)	1	> 4	0,00004	0,0002	0,00002	Van den Belt <i>et al.</i> (2003)
Peixe (<i>Fundulus heteroclitis</i>)	1	-	0,05	0,005	0,01	Pait e Nelson (2003)
Peixe (<i>Cyprinodon variegates</i>)	1	1,9	0,02	-	-	Folmar <i>et al.</i> (2002)
Peixe (<i>Danio rerio</i>)	1	16,6	-	-	-	Rose <i>et al.</i> (2002)
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1	15,4	0,001	-	-	Thorpe <i>et al.</i> (2001)
Trutas (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1	-	-	0,01	-	Routledge <i>et al.</i> (1998)
Peixe (<i>Rutilus rutilus</i>)	1	-	-	0,001	-	Routledge <i>et al.</i> (1998)

Thorpe *et al.* (2003) avaliaram a concentração média (CE₅₀) que causa indução da vitelogenina em peixes e verificaram que 17 α -etinilestradiol apresentou potencial estrogênico de 11 a 27 vezes maior que 17 β -estradiol, enquanto que 17 β -estradiol

apresentou de 2,3 a 3,2 maior que estrona. De acordo com Brian *et al.* (2005), 17α -etinilestradiol apresentou potencial estrogênico de 25 a 30 vezes maior que 17β -estradiol, utilizando o ensaio *in vivo* da indução de vitelogenina. Segundo Fent *et al.* (2006), o potencial estrogênico *in vivo* de 17α -etinilestradiol é de 10 a 50 vezes maior que de 17β -estradiol provavelmente devido ao menor metabolismo.

Segundo Coldham *et al.* (1997), em ensaios *in vitro* a potência estrogênica de 17α -etinilestradiol é da mesma ordem de grandeza que de 17β -estradiol. Na Tabela 2.16 é mostrada a comparação do potencial estrogênico *in vitro* de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol obtida por diversos pesquisadores, tanto pelo ensaio YES, como para o teste MCF-7.

Tabela 2.16. Comparação do potencial estrogênico *in vitro* de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol.

Ensaio	17β -estradiol	17α -etinilestradiol	Referência
YES	1	0,63	Sun <i>et al.</i> (2008)**
	1	0,75	Beck <i>et al.</i> (2006)**
	1	0,9	Van den Belt <i>et al.</i> (2004)**
	1	0,74	Matsumoto <i>et al.</i> (2004)*
	1	2,2	Svenson <i>et al.</i> (2003)*
	1	2,4	Svenson <i>et al.</i> (2003)**
	1	0,7	Folmar <i>et al.</i> (2002)**
	1	1,6	Andersen <i>et al.</i> (1999)*
MCF-7	1	1,9	Folmar <i>et al.</i> (2002)**
	1	1,25	Gutendorf e Westendorf (2001)**
	1	2,95	Behnisch <i>et al.</i> (2001)**
	1	0,98	Schuller (1998)** (apud Behnisch <i>et al.</i> (2001))
	1	0,9	Soto <i>et al.</i> (1995)**

* relativo à CE_{50} em massa/volume.

** relativo à CE_{50} em mol/volume.

A variação obtida no potencial estrogênico dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol pelos diversos pesquisadores pode ser devida a pequenas diferenças encontradas no procedimento de análise, como tempo de incubação e dosagem de reagente.

2.1.7.2. Combinação de Compostos Estrogênicos

Os estrogênios esteróides, como 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, são capazes de elucidar efeitos estrogênicos em peixes quando presentes na água em baixas concentrações, da ordem de ng l⁻¹ (Thorpe *et al.*, 2003). Essas substâncias apresentam alto risco para humanos e animais. Em contraste, as substâncias químicas que mimetizam a ação de estrogênios (xenoestrogênios), como os alquilfenóis, exibem potenciais estrogênicos muito inferiores e raramente são encontrados no ambiente em concentrações que podem causar efeito (Desbrow *et al.*, 1998). Consequentemente, a avaliação individual dessa substância pode mostrar que ela não apresenta risco ao meio ambiente. Entretanto, quando combinadas com outras substâncias estrogênicas, essas substâncias podem apresentar atividade estrogênica significativa (Brian *et al.*, 2005).

Portanto, a avaliação do efeito obtido pela combinação de compostos estrogênicos é muito importante, uma vez que, no ambiente, os desreguladores endócrinos não são encontrados separadamente e esses contaminantes ambientais podem interagir entre si de modo a aumentar a atividade estrogênica dessas substâncias. Entretanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura avaliando a eficiência de remoção de desreguladores endócrinos quando combinados.

Três tipos de efeitos podem ser observados na atividade estrogênica com a combinação de substâncias estrogênicas: sinergismo, antagonismo e aditivo. Sinergismo e antagonismo podem ser definidos como desvios dos efeitos esperados, onde sinergismo representa efeito maior que o esperado e antagonismo representa efeito menor. Quando os efeitos esperados são obtidos, o efeito obtido da combinação pode ser definido como aditivo.

O teste de atividade estrogênica YES é bastante indicado para a obtenção do efeito obtido da combinação de compostos estrogênicos, uma vez que é altamente reprodutível e sensível (Payne *et al.*, 2000).

Um método de avaliação do efeito obtido da combinação de compostos estrogênicos consiste em somar aritmeticamente a atividade individual de cada componente da mistura e comparar com a atividade da mistura. Caso a atividade da mistura seja maior do que a soma das atividades individuais, o efeito é sinérgico (Arnold *et al.*, 1997b; Soto *et al.*, 1995). Se a atividade da mistura for igual à soma das atividades das substâncias separadamente, o efeito é aditivo. Entretanto, esse método é aplicado somente para compostos com curvas dose-resposta lineares, levando a resultados irrealistas quando utilizada para a maioria dos estrogênios, que apresentam curvas sigmoidais.

Essa mesma dificuldade ocorre para um grupo de substâncias que apresentam diferentes formas de curva dose-resposta para a atividade estrogênica. Nesse caso, o efeito resultante da combinação não pode ser calculado por meio de uma simples adição dos valores obtidos para os componentes da mistura, quando avaliados separadamente (Fent *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2002; Kortenkamp e Altenburger, 1998).

2.1.7.2.1. Efeito Aditivo na Combinação de Compostos Estrogênicos

Chen *et al.* (2007) utilizaram o ensaio YES para a avaliação da estrogenicidade e mostraram que o efeito aditivo foi obtido durante a combinação das substâncias estrogênicas 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol, em relação aos compostos separadamente.

Brian *et al.* (2005) investigaram o efeito obtido da combinação de cinco substâncias químicas estrogênicas (17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, nonilfenol, octilfenol e bisfenol A), utilizando o ensaio da indução de vitelogenina em peixes machos (*Pimephales promelas*). Os resultados mostraram que o efeito combinado foi o aditivo, mesmo para baixas concentrações das substâncias.

Silva *et al.* (2002) mostraram que várias substâncias fracamente estrogênicas, quando combinadas em concentrações abaixo das concentrações onde se observa efeito estrogênico, resultaram em mistura com significativa atividade estrogênica, quando utilizaram o teste de atividade estrogênica YES. Isso mostra que grande importância deve ser dada as substâncias estrogênicas, mesmo àquelas presentes em baixas concentrações, uma vez que a combinação de diversas substâncias fracamente estrogênicas pode ser resultar em uma alta atividade estrogênica.

No trabalho de Rajapakse *et al.* (2001) foi avaliado o comportamento do bisfenol A e DDT quando combinados com o 17β -estradiol, utilizando o teste de atividade estrogênica YES. Eles observaram que o efeito combinado não desviou do comportamento aditivo.

2.1.7.2.2. Efeito Sinérgico na Combinação de Compostos Estrogênicos

Chen *et al.* (2007) mostraram que o efeito sinérgico foi obtido durante a combinação das substâncias estrogênicas 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, nonilfenol e bisfenol A, em relação aos compostos separadamente, utilizando o ensaio YES. Arnold *et al.* (1997) observaram esse mesmo efeito na combinação de 17α -estradiol com estrona e na combinação de 17β -estradiol com 17α -estradiol, utilizando ensaio *in vitro*.

Arnold *et al.* (1996) utilizaram o ensaio YES e verificaram que a combinação de duas substâncias fracamente estrogênicas, como dieldrin e endosulfan ou toxafeno resultou em uma mistura com estrogenicidade muito superior que a estrogenicidade apresentada por essas substâncias separadamente. Esses resultados mostraram que a combinação de substâncias estrogênicas, mesmo que com baixa estrogenicidade, pode resultar em grandes efeitos ao meio ambiente.

2.2. Degradação de Desreguladores Endócrinos

O principal fator que influencia a remoção de poluentes presentes em amostras aquosas é a habilidade dos poluentes em interagir com partículas sólidas, naturais (lodo, sedimentos ou microorganismos) ou adicionar ao meio (carvão ativo ou coagulantes),

pois isto facilita a remoção por processos físico-químicos (floculação) ou processos biológicos (biodegradação). Entretanto, compostos com baixos coeficientes de adsorção tendem a permanecer na fase aquosa, o que favorece a mobilidade pelo sistema de tratamento de esgoto e pelas águas receptoras. Deste modo, muitos produtos farmacêuticos permanecem na fase aquosa, como os anti-inflamatórios e os antibióticos, enquanto outros podem ser adsorvidos no lodo, como os estrogênios (Carballa *et al.*, 2004).

O esgoto municipal é a principal fonte de desreguladores endócrinos no meio ambiente. Conseqüentemente, técnicas eficientes de tratamentos devem ser desenvolvidas para prevenir a propagação desse tipo de poluição.

Estudos indicaram que as propriedades físico-químicas, especialmente a hidrofobicidade e a biodegradabilidade influenciam a remoção de desreguladores endócrinos e fármacos (Nakada *et al.*, 2006). Entretanto, muitos trabalhos mostraram uma larga variação na eficiência de remoção dessas substâncias, levando a concluir que outros fatores também afetam a eficiência de remoção.

A remoção física ou degradação de desreguladores endócrinos por meio de vários processos, incluindo membranas (Kimura *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004; Nghiem *et al.*, 2004), adsorção (Zhang e Zhou, 2005), oxidação por dióxido de cloro (Huber *et al.*, 2005), ozônio (Irmak *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2003) e por Processos Oxidativos Avançados, incluindo UV/O₃ (Westerhoff *et al.*, 2005; Irmak *et al.*, 2005), UV/H₂O₂ (Rosenfeldt e Linden, 2004) e fotocatalise com TiO₂ (Ohko *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2002), foi reportada na literatura. Nelson *et al.* (2007) verificaram que os tratamentos primário e secundário não foram suficientes para remover desreguladores endócrinos ou traços de substâncias orgânicas como hormônios, fármacos e pesticidas em esgoto doméstico.

Dentre as técnicas oxidativas utilizadas, a ozonização e os processos oxidativos avançados têm-se mostrado como tecnologias promissoras na remoção de micropoluentes (como os estrogênios) presentes em matrizes aquosas, como águas e efluentes, uma vez que utilizam fortes agentes oxidantes: ozônio molecular e radicais OH (Camel e Bermond, 1998).

2.2.1. Ozonização

2.2.1.1. Ozônio

O ozônio é um gás incolor a temperatura ambiente com fórmula molecular O_3 e massa molar de 48 g mol^{-1} . É um forte agente oxidante, atacando praticamente todos os compostos orgânicos, sendo sua ação muito rápida. Em altas concentrações é um gás tóxico, sofre decomposição rápida em altas temperaturas e tem um odor peculiar similar ao do cloro. É instável em água, possuindo uma meia-vida de minutos, devendo, portanto, ser produzido *in-situ* (no local e no momento a ser consumido) (Azevedo, 2003; Harrison, 2000; Evans, 1974).

É capaz de reagir com uma numerosa classe de compostos orgânicos, devido, principalmente, ao seu elevado potencial de oxidação ($E^0 = 2,07 \text{ V}$), superior ao de compostos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o próprio cloro, conforme pode ser observado na Tabela 2.17. Em pH básico, decompõe-se levando à formação de radicais hidroxila cujo potencial de oxidação é ainda mais elevado ($E^0 = 2,80 \text{ V}$) (Almeida *et al.*, 2004). A eficiência total da ação do ozônio é determinada pelos fatores: reatividade química do composto, volatilidade, concentração residual de ozônio na fase líquida, coeficiente de transferência de massa na coluna de contato, área interfacial gás-líquido e composição química da água (Evans, 1972).

Tabela 2.17. Potencial de oxidação para oxidantes em água.

Oxidante	Potencial de oxidação (eV)
Radical Hidroxila ($\cdot OH$)	2,80
Ozônio	2,07
Peróxido de Hidrogênio	1,77
Íon permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Cloro	1,36
Oxigênio	1,23

Fonte: CRC Handbook (1985).

2.2.1.2. Geração de Ozônio

A molécula do ozônio é consideravelmente instável. Portanto, o ozônio não pode ser armazenado ou transportado como outros gases, uma vez que, quando acondicionado em recipientes, ele decai continuamente até que reste somente o oxigênio. Portanto, ele só pode ser produzido no local e no momento a ser consumido, a partir do oxigênio puro ou de misturas gasosas que contenham oxigênio, como o ar.

As três técnicas de geração de ozônio mais importantes são: descarga elétrica, eletrólise e radiação química. A descarga elétrica e a eletrólise fornecem maiores concentrações de ozônio, sendo a descarga elétrica a técnica mais difundida por ser a única viável em larga escala, devido ao fato de se obter maior taxa de conversão do oxigênio em ozônio (Balakrishnan *et al.*, 2002; Gottschalk *et al.*, 2002; Magara *et al.*, 1995; Glaze, 1987).

Pelo método da descarga elétrica, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 10 kV) (Almeida *et al.*, 2004), conforme Equações 2.4 e 2.5. O rendimento deste processo varia entre 1 e 4 % (m/m) e entre 6 e 14 % (m/m) para sistemas alimentados por ar e oxigênio puro, respectivamente (Balakrishnan *et al.*, 2002).



2.2.1.3. Decomposição do Ozônio em Fase Líquida

O ozônio é instável em água. A decomposição do ozônio em águas naturais é caracterizada por uma rápida diminuição da sua concentração inicial, seguida de uma segunda fase na qual a concentração diminui mais lentamente. O principal produto de decomposição do ozônio é o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). A estabilidade do ozônio no meio depende de diversos fatores, dentre eles o pH merece especial atenção, uma vez que os íons hidroxila iniciam o processo de decomposição do ozônio, como mostrado nas Equações 2.6 a 2.8 (von Gunten, 2003).



A decomposição do ozônio pode ser acelerada pelo aumento do pH, pela adição de peróxido de hidrogênio ou por luz UV (Almeida *et al.*, 2004; von Gunten, 2003). Desta maneira, a oxidação de compostos orgânicos durante a ozonização pode ocorrer via ozônio molecular (reação direta - predominante em meio ácido) ou radical hidroxila (reação indireta - predominante em meio básico). Em pH neutro, ambos oxidantes podem estar atuando.

2.2.1.4. Aplicações do Ozônio

A primeira aplicação do ozônio no tratamento de água foi em 1893, para tratamento de água da cidade de Oudshoorn, na Holanda. Em 1970, foi utilizado para tratamento de água de torres de resfriamento. Hoje, é aplicado em diversas atividades como no tratamento de água, no tratamento de efluente, para redução de lodo biológico, no controle de odor nas plantas de tratamento de esgoto, em indústrias no processamento de alimentos, entre outras (Mayes e Ruisinger, 1998; Glaze, 1987).

No tratamento de água, o ozônio pode ser usado em várias etapas do processo com o objetivo de aumentar a biodegradabilidade, remover ferro e manganês, degradar micropoluentes e remover sabor e odor. É importantíssimo na desinfecção de água potável, pois é efetivo na remoção de bactérias e vírus (Balakrishnan *et al.*, 2002; Paraskeva, 2002; Harrison, 2000; Magara *et al.*, 1995). Porém, como o seu tempo de meia vida é baixo, há a necessidade do uso do cloro para distribuição da água.

Em uma estação de tratamento de efluentes, o ozônio pode ser utilizado para desinfecção do efluente, no tratamento terciário para redução de DQO e aumento da biodegradabilidade, na redução da cor, na diminuição da turbidez, na redução do lodo biológico e no controle do odor. O ozônio apresenta vantagens no tratamento de águas e efluentes: é um forte agente oxidante, resultando em uma oxidação rápida, é um germicida muito eficiente, aumenta a concentração de oxigênio dissolvido na água ou

no efluente tratado e apresenta vantagem em relação ao cloro, pois os produtos oxidados ou parcialmente oxidados por ozônio são geralmente menos tóxicos que os clorados (Harrison, 2000; Evans, 1974).

2.2.1.5. Degradação de Estrogênios por Ozonização

Existem na literatura alguns trabalhos relacionados à degradação de estrogênios pelo processo de ozonização (Bila, 2005; Kim *et al.*, 2004; Ternes *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2003). Na Tabela 2.18 são apresentados os resultados de degradação de estrogênios por ozonização.

Tabela 2.18. Degradação de estrogênios por ozonização.

Estrogênio	Matriz	Resultado	Referência
Estrona 17 β -estradiol	Efluente	A ozonização foi eficiente na remoção de estrona e de 17 β -estradiol: mais de 80 % de remoção foi alcançada.	Nakada <i>et al.</i> (2007)
17 β -estradiol	Água Efluente de ETE	Remoção superior a 99 % de 17 β -estradiol em água com baixo consumo de O ₃ (1 mg l ⁻¹). Apesar da alta remoção, a concentração remanescente ainda apresentou atividade estrogênica. O 17 β -estradiol foi mais lentamente oxidado na matriz esgoto.	Bila (2005)
17 β -estradiol	Água Destilada	15 minutos de ozonização foram suficientes para remover 90 % de 17 β -estradiol.	Liu <i>et al.</i> (2005)
17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol Estril Estrona	Água Mili-Q	Para todos os estrogênios avaliados, a exposição a 2 10 ⁻³ mg min l ⁻¹ de ozônio resultou em 95 % de remoção. A ozonização foi muito mais eficiente do que a cloração na remoção de compostos estrogênicos.	Deborde <i>et al.</i> (2004) e Deborde <i>et al.</i> (2005)
17 β -estradiol	Água	Concentração de ozônio de 15 mg l ⁻¹ degradou 99 % da concentração inicial de 17 β -estradiol em 4 min. Não foram formados subprodutos estrogênicos.	Kim <i>et al.</i> (2004)
Estrona	Efluente de ETE	Dosagem de O ₃ de 5 a 15 mg l ⁻¹ foi apropriada para oxidar a estrona, com simultânea inativação dos microrganismos presentes no efluente.	Ternes <i>et al.</i> (2003)
17 α -etinilestradiol	Águas Naturais	Doses de O ₃ na faixa de 0,2 a 0,5 mg l ⁻¹ foram capazes de remover 17 α -etinilestradiol acima de 97 %.	Huber <i>et al.</i> (2003)

2.2.2. Processos Oxidativos Avançados

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) são eficientes para destruir substâncias orgânicas de difícil degradação e muitas vezes em baixas concentrações. São processos que envolvem a geração de radicais hidroxilas OH, fortes agentes oxidantes.

A maioria dos Processos Oxidativos Avançados utiliza a combinação de fortes oxidantes (O_3 e H_2O_2), catalisadores (íons de metais de transição ou fotocatalisadores) e irradiação ultravioleta (UV) (Huang *et al.*, 1993). Os processos mais comumente empregados são: O_3/H_2O_2 , O_3/UV , H_2O_2/UV , ozônio em pH básico e fotocatalise com TiO_2 . A ozonização é considerada um processo oxidativo avançado em pH básico devido à rápida decomposição do ozônio em radical OH (Hoigné e Bader, 1976).

O sucesso dos Processos Oxidativos Avançados baseia-se no fato de que as taxas de reação entre os radicais OH e muitos poluentes orgânicos são altas (Munter, 2001). Na Tabela 2.19 são mostradas as taxas de oxidação de compostos orgânicos com ozônio (O_3) e radicais hidroxila ($\bullet OH$) em água e na Tabela 2.20 tem-se a taxa de oxidação de fármacos com o ozônio e radicais OH a temperatura ambiente.

2.2.2.1. Ozônio/Peróxido de Hidrogênio

No sistema O_3/H_2O_2 os radicais hidroxila são gerados pela interação entre o ozônio e o peróxido de hidrogênio. O H_2O_2 pode iniciar o decaimento do ozônio, levando a formação de radicais OH. A reação global que descreve este mecanismo é dada pela Equação 2.9 (Esplugas *et al.* (2002)).



Brunet *et al.* (1984) e Duguet *et al.* (1985) (apud Gottschalk *et al.*, 2002) e Zwiener e Frimmel (2000) verificaram que a adição de peróxido de hidrogênio aumenta a eficiência na oxidação de várias substâncias orgânicas. Uma dosagem ótima encontrada na literatura de H_2O_2/O_3 em base molar é de 0,5 a 1, pois concentrações de peróxido de hidrogênio superiores às consideradas ideais ao processo implicam num acúmulo do oxidante no meio reacional, que passa a agir como capturador dos radicais

hidroxila, resultando numa diminuição da eficiência de degradação (Balcioglu e Ötger, 2003; Paillard *et al.*, 1988).

Tabela 2.19. Taxas de oxidação de compostos orgânicos com O₃ e radicais OH.

Classe de compostos	Constante de Velocidade da reação (M ⁻¹ s ⁻¹)	
	O ₃	•OH
Acetilenos	50	10 ⁸ – 10 ⁹
Álcoois	10 ⁻² – 1	10 ⁸ – 10 ⁹
Aldeídos	10	10 ⁹
Alcanos	10 ⁻²	10 ⁶ – 10 ⁹
Aromáticos	1 – 10 ²	10 ⁸ – 10 ¹⁰
Ácidos carboxílicos	10 ⁻³ – 10 ⁻²	10 ⁷ – 10 ⁹
Alquenos clorados	10 ⁻¹ – 10 ³	10 ⁹ – 10 ¹¹
Cetonas	1	10 ⁹ – 10 ¹⁰
Orgânicos contendo nitrogênio	10 – 10 ²	10 ⁸ – 10 ¹⁰
Olefinas	1 – 450.10 ³	10 ⁹ – 10 ¹¹
Fenóis	10 ³	10 ⁹ – 10 ¹⁰
Orgânicos contendo enxofre	10 – 1,6.10 ³	10 ⁹ – 10 ¹⁰

Fonte: Cater *et al.* (1990).

Tabela 2.20. Taxa de oxidação de fármacos com o ozônio e radicais OH a temperatura ambiente.

Composto	k _{O₃} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{OH} (M ⁻¹ s ⁻¹)
Diclofenaco	1x10 ⁶	7,5x10 ⁹
Carbamazepina	3x10 ⁵	8,8x10 ⁹
Sulfametoxazol	2,5x10 ⁶	5,5x10 ⁹
17α-etinilestradiol	7x10 ⁹	9,8x10 ⁹

Fonte: Huber *et al.* (2003).

2.2.2.2. Degradação de Estrogênios por Processos Oxidativos Avançados

Existem diversos processos oxidativos avançados utilizados para a degradação de desreguladores endócrinos presentes em águas e efluentes. Dentre eles, O₃/UV, O₃/H₂O₂, UV/H₂O₂, Fotólise, Fotocatálise com TiO₂ e foto-Fenton (Rosenfeldt *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Irmak *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2005a; Liu e Liu, 2004). Na Tabela 2.21 são apresentados os resultados da remoção de estrogênios por processos oxidativos avançados.

2.2.3. Degradação de Estrogênios por Processos Biológicos

Dentre os processos biológicos, o mais empregado para degradação de estrogênios é o processo de lodo ativado, capaz de remover de 65 a 99 % de 17 β -estradiol, conforme trabalhos de Esperanza *et al.* (2007), Servos *et al.* (2005) e Johnson e Sumpter (2001). Com relação a 17 α -etinilestradiol, as remoções obtidas variam largamente, de 34 a 98 %, conforme trabalhos de Esperanza *et al.* (2007), Cargouet *et al.* (2004), Huber *et al.* (2004), Rudder *et al.* (2004), Liu *et al.* (2003), Svenson *et al.* (2003), Johnson *et al.* (2000) e Baronti *et al.* (2000). Trabalhos publicados na literatura mostram uma baixa remoção de estrona (Carballa *et al.*, 2004; Baronti *et al.*, 2000; Ternes *et al.*, 1999a), devido à oxidação parcial de 17 β -estradiol, levando a formação de estrona. Na Tabela 2.22 são mostrados alguns trabalhos publicados na literatura avaliando a remoção dos estrogênios por processos biológicos.

2.2.4. Degradação de Estrogênios por Outros Processos

Na Tabela 2.23 são apresentados alguns trabalhos publicados na literatura avaliando a remoção dos estrogênios por processos como nanofiltração, osmose reversa, oxidação eletroquímica e dióxido de cloro (Jiang *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2005; Nghiem *et al.*, 2004). Coagulação, floculação e precipitação são ineficazes na remoção de micropoluentes presentes em ambientes aquáticos (Westerhoff *et al.*, 2005; Ternes *et al.*, 2002).

Tabela 2.21. Remoção de estrogênios por processos oxidativos avançados.

Estrogênio	Matriz	Processo	Resultado	Referência
17 β -estradiol	Água Mili-Q	foto-Fenton Fenton	O processo de foto-Fenton foi capaz de remover 86,4 % de 17 β -estradiol após 8 h de reação, enquanto que o processo de Fenton removeu apenas 40,1 %.	Yaping e Jiangyong (2008)
Estrona 17 β -estradiol	Água Ultrapura	Fotocatálise com TiO ₂	No reator com lâmpada de 150 W, 97 % das substâncias foram degradadas com 4 h de irradiação. No reator com lâmpada de 15W, 98 % das substâncias desapareceram com 1 h de tratamento, devido à menor faixa de comprimento de onda da lâmpada de UV (fixada a 253 nm) em relação à lâmpada de 150W (238–579 nm).	Zhang <i>et al.</i> (2007)
17 β -estradiol Bisfenol A	Água	O ₃ O ₃ /UV	O ₃ /UV possibilitou remoção igual ao processo de O ₃ com diminuição de 22,5 % no consumo de O ₃ .	Irmak <i>et al.</i> (2005)
17 β -estradiol Estriol 17 α -etinilestradiol	Água	Fotocatálise Fotólise	Fotocatálise e fotólise foram capazes de degradar os três compostos. A fotocatalise mostrou-se mais efetiva que a fotólise. O 17 α -etinilestradiol foi degradado primeiramente devido à tripla ligação que absorve a luz UV mais facilmente.	Coleman <i>et al.</i> (2005)

Continuação da Tabela 2.21. Remoção de estrogênios por processos oxidativos avançados.

Estrogênio	Matriz	Processo	Resultado	Referência
17 β -estradiol	Água	foto-Fenton	O processo de foto-Fenton foi eficiente na remoção de 17 β -estradiol: remoção de 75,2 % com 10,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de Fe(III), 1000 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de H ₂ O ₂ , pH 3 e 160 min de tratamento. Entretanto, a porcentagem de mineralização foi baixa. Provavelmente, a mineralização ocorreu somente no anel aromático, enquanto que outros anéis alicíclicos não foram degradados.	Feng <i>et al.</i> (2005b)
Estrona 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol	Água	foto-Fenton	Estrona pôde ser decomposta eficazmente, sendo que a eficiência de degradação foi dependente do pH inicial e das concentrações de Fe(III) e H ₂ O ₂ . A degradação da estrona foi iniciada no anel aromático. A mineralização provavelmente ocorreu somente no anel aromático. A seqüência das taxas de degradação foi: $E_2 > EE_2 > E_1$.	Feng <i>et al.</i> (2005a)
17 β -estradiol Estrona	Água	Fotólise	Fotólise de 17 β -estradiol ocorreu sob irradiação da luz UV, enquanto a estrona sofreu fotólise com irradiação de luz de alta pressão. A fotólise foi favorecida na faixa de pH de 6 a 8.	Liu e Liu (2004)
17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol	Água	Fotólise UV/H ₂ O ₂	O processo UV/H ₂ O ₂ (concentração de H ₂ O ₂ de 15 mg l ⁻¹) foi mais efetivo que a fotólise. A fotólise degradou aproximadamente 20 % dos estrogênios, enquanto o processo UV/H ₂ O ₂ , 90 %.	Rosenfeldt e Linden (2004)

Continuação da Tabela 2.21. Remoção de estrogênios por processos oxidativos avançados.

Estrogênio	Matriz	Processo	Resultado	Referência
17 α -etinilestradiol	Água	Luz UV	Houve uma redução da concentração de 17 α -etinilestradiol durante a irradiação com a lâmpada de UV. A fotodegradação de 17 α -etinilestradiol causou a quebra e oxidação do anel aromático produzindo compostos contendo grupos carbonila.	Liu <i>et al.</i> (2003)
17 β -estradiol	Água	Fotocatálise com TiO ₂	Uma solução 10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ de 17 β -estradiol foi totalmente mineralizada a CO ₂ com 1,0 g l ⁻¹ de suspensão de TiO ₂ sobre radiação UV por 3 h. O espectro de massa confirmou que o grupo fenólico foi primeiramente oxidado.	Ohko <i>et al.</i> (2002)
17 β -estradiol	Água	Fotocatálise com TiO ₂ imobilizado	Soluções de 17 β -estradiol (0,05 a 3 μ mol l ⁻¹) foram degradadas em 98 % após 3,5 horas e em 50 % com 40 minutos de fotocatalise.	Coleman <i>et al.</i> (2000)

Tabela 2.22. Remoção de estrogênios por processos biológicos.

Estrogênio	Matriz	Processo	Resultado	Referência
Estrona 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol Estriol	Efluente	Lodo Ativado	O tratamento secundário foi capaz de remover somente 40,2 % do EE ₂ , enquanto que as remoções obtidas para E ₁ , E ₂ e E ₃ foram de 83, 99 e 80 %, respectivamente.	Esperanza <i>et al.</i> (2007)
17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol	Efluente	Lodo Ativado Reator com membranas (MBR)	O processo de lodo ativado com longos tempos de retenção hidráulica e de retenção do lodo mostrou-se eficiente na remoção de estrogênios: acima de 90 %. Bom desempenho também foi obtido na remoção de estrogênios com biorreatores com membrana (MBR): acima de 98 % para estrogênios naturais.	Johnson <i>et al.</i> (2007)
Estrona 17 β -estradiol Estriol	Efluente	Lodo Ativado	Os estrogênios naturais foram removidos com alta eficiência: 86 % para estrona, 90 % para 17 β -estradiol e 100 % para estriol.	Nakada <i>et al.</i> (2006)
Estrona 17 β -estradiol Estriol	Efluente	SBR – Reator de Batelada Sequencial	Remoção quase completa dos estrogênios, utilizando tempo de retenção do lodo maior que 10 dias.	Clara <i>et al.</i> (2005)
17 β -estradiol	Efluente de ETE	Lodo Ativado	Remoção de 75 % de 17 β -estradiol das ETE pelo processo de lodos ativados.	Servos <i>et al.</i> (2005)

Continuação da Tabela 2.22. Remoção de estrogênios por processos biológicos.

Estrogênio	Matriz	Processo	Resultado	Referência
17 α -etinilestradiol	Água	Bioreator recheado	Remoção de 81,7 % com tempo de retenção hidráulica de 1h.	Rudder et al. (2004)
Estrona 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol Estriol	Efluente Sintético	Lodo Ativado	As remoções de estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estriol foram superiores a 52, 94, 50 e 65 %, respectivamente.	Esperanza et al. (2004)
Estrona 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol	Efluente de ETE	Lodo Ativado	A maior remoção foi obtida para 17 β -estradiol: acima de 88 %. As remoções de 17 α -etinilestradiol e de estrona foram superiores a 71 e 49 %, respectivamente.	Joss et al. (2004)
Estrona 17 β -estradiol	Efluente de ETE	Tratamento Primário Lodo Ativado	Com o tratamento primário somente 20 % de 17 β -estradiol foi removido. O tratamento aeróbio de lodos ativados resultou em remoção de 65 % para 17 β -estradiol. Verificou-se um aumento da concentração de estrona ao longo do tratamento, devido à oxidação parcial de 17 β -estradiol.	Carballa et al. (2004)
Estrona 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol	Esgoto	Lodo ativado	Remoção de aproximadamente 85 % destes hormônios.	Johnson e Sumpter (2001)

Continuação da Tabela 2.22. Remoção de estrogênios por processos biológicos.

Estrogênio	Matriz	Processo	Resultado	Referência
Estrona 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol	Esgoto	Lodo ativado	Remoção de aproximadamente 85 % destes hormônios.	Johnson e Sumpter (2001)
Estriol 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol Estrona	Efluente de ETE	Lodos ativados	Tratamento foi eficiente nas remoções de estriol (95 %), 17 β -estradiol (87 %) e 17 α -etinilestradiol (85 %). Porém, a remoção de estrona foi de apenas 61 %.	Baronti et al. (2000)
17 α -etinilestradiol	Efluente de ETE	Lodo ativado	O processo foi capaz de degradar completamente 17 α -etinilestradiol em seis dias de tratamento. A oxidação de 17 α -etinilestradiol resultou na diminuição da atividade estrogênica.	Vader <i>et al.</i> (2000)
17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol Mestranol	Água	Lodo ativado	O estrogênio natural 17 β -estradiol foi oxidado a estrona, o contraceptivo 17 α -etinilestradiol foi persistente às condições aeróbias enquanto mestranol foi rapidamente degradado.	Ternes <i>et al.</i> (1999a)

Tabela 2.23. Remoção de estrogênios por outros processos.

Estrogênio	Matriz	Processo	Resultado	Referência
17 β -estradiol Estrona	Afluente de ETE	Ferro (VI) e oxidação eletroquímica	Ferro (IV) e oxidação eletroquímica foram capazes de reduzir os estrogênios a níveis muito baixos, variando entre 10 e 100 ng l ⁻¹ , sendo que o primeiro processo foi mais efetivo do que o segundo. Os resultados mostraram que, tanto o Ferro (VI) quanto a oxidação eletroquímica são técnicas promissoras no tratamento de desreguladores endócrinos.	Jiang <i>et al.</i> (2005)
17 α -etinilestradiol	Água	Dióxido de Cloro (ClO ₂)	Comparado com ozônio, a reação entre 17 α -etinilestradiol e ClO ₂ foi mais lenta. Entretanto, a reação entre 17 α -etinilestradiol e ClO ₂ foi mais rápida do que a reação com cloro. ClO ₂ foi efetivo na oxidação de 17 α -etinilestradiol.	Huber <i>et al.</i> (2005)
Estrona 17 β -estradiol	Efluente de ETE	Nanofiltração Osmose Reversa	As membranas puderam reter os estrogênios efetivamente.	Nghiem <i>et al.</i> (2004)
17 β -estradiol	Água Mili-Q	Cloro	A reação de 17 β -estradiol com HOCl foi rápida e eficiente, entretanto foram formados vários subprodutos que apresentaram alta atividade estrogênica.	Hu <i>et al.</i> (2003)

2.3. Remoção da Atividade Estrogênica por Diferentes Processos

Estudos sugerem que há somente um encaixe perfeito de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol ao receptor de estrogênio: por meio do anel fenólico do esteróide (Huber *et al.*, 2003). Portanto, um processo capaz de degradar ou alterar a parte fenólica das moléculas desses estrogênios pode ser efetivo na remoção da estrogenicidade.

Esplugas *et al.* (2002) mostraram que a ozonização e o processo de O_3/H_2O_2 foram eficazes na degradação de fenol, uma vez que foram obtidas remoções acima de 80 %. Portanto, esses processos tendem a ser efetivos na remoção da atividade estrogênica.

Estudos encontrados na literatura (Chen *et al.*, 2007; Rosenfeldt *et al.*, 2007; Alum *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004) mostraram reduções na atividade estrogênica de estrogênios como 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol após tratamentos com processos oxidativos.

Na Tabela 2.24 são apresentados alguns resultados obtidos para a atividade estrogênica após a degradação de estrogênios por processos oxidativos.

Tabela 2.24. Redução da atividade estrogênica por processos oxidativos.

Processo	Resultado	Referência
UV/H ₂ O ₂	O processo de UV/H ₂ O ₂ (10 ppm de H ₂ O ₂ e UV <1000 mJ cm ⁻²) foi capaz de diminuir a atividade estrogênica da mistura a baixos valores. A taxa de remoção da atividade estrogênica da mistura de estrogênios foi menor do que a observada para os compostos separadamente e a remoção da atividade estrogênica foi menor na água natural do que na água deionizada. A taxa de remoção da atividade estrogênica foi mais lenta na água natural devido a uma diminuição na concentração de radicais OH por causa do efeito capturador de componentes presentes na água natural, como o COT.	Chen <i>et al.</i> (2007)
UV/H ₂ O ₂	Utilizando o teste YES, foi obtida remoção de 90 % na atividade estrogênica de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol (3 µg l ⁻¹) utilizando a combinação de 5 mg l ⁻¹ de H ₂ O ₂ com UV de 350 mJ cm ⁻² . A similaridade entre a oxidação e a remoção da atividade estrogênica levou a conclusão que nenhum dos subprodutos formados apresentou atividade estrogênica semelhante a esses estrogênios.	Rosenfeldt <i>et al.</i> (2007)
Lodo Ativado	Foram obtidas remoções de 51 a 90 % na estrogenicidade de afluentes de ETE no Japão pelo processo de lodo ativado, utilizando o ensaio YES.	Hashimoto <i>et al.</i> (2007)
Ozonização	15 minutos de ozonização foram capazes de remover mais de 90 % de 17β-estradiol. A remoção da atividade estrogênica dos subprodutos formados foi um pouco inferior: 87 %.	Liu <i>et al.</i> (2005)

Continuação da Tabela 2.24. Redução da atividade estrogênica por processos oxidativos.

Processo	Resultado	Referência
Ozonização	Doses de ozônio tipicamente aplicadas na desinfecção de águas potáveis foram suficientes para reduzir a estrogenicidade em mais de 200 vezes, utilizando o ensaio YES. Entretanto, foi impossível remover completamente a atividade estrogênica de 17 α -etinilestradiol em pH 8, devido aos subprodutos formados durante a ozonização. Verificaram que, com o aumento da dosagem de ozônio, o aumento na redução da atividade estrogênica foi lento.	Huber <i>et al.</i> (2004)
Ozonização	Utilizando o teste MCF-7, obtiveram alta remoção da estrogenicidade. Entretanto, a atividade estrogênica não foi completamente removida para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, provavelmente devido à formação de subprodutos com atividade estrogênica.	Alum <i>et al.</i> (2004)
Ozonização	Durante a ozonização de 17 β -estradiol em pH 6, a estrogenicidade não foi reduzida significativamente com o aumento da dosagem de ozônio. Concluíram que a ozonização foi responsável pela formação de subprodutos com atividade estrogênica similar a de 17 β -estradiol, uma vez que essas substâncias foram rapidamente removidas no início da ozonização.	Kim <i>et al.</i> (2004)
Lodo Ativado	Foram obtidas remoções de 58 a 94 % na estrogenicidade de amostras de efluentes em estações de tratamento de esgoto na Suécia pelo processo de lodo ativado, utilizando o teste YES. A combinação do processo de lodo ativado com um subsequente estágio anóxico possibilitou uma maior remoção da estrogenicidade provavelmente devido a maior duração do tratamento biológico.	Svenson <i>et al.</i> (2003)

2.4. Mecanismos de Reação de Estrogênios com Ozônio Molecular e Radicais OH

A reação entre o ozônio e as substâncias químicas pode ser direta ou indireta. A reação indireta envolve a geração do radical OH, um oxidante não seletivo. A oxidação direta dos compostos orgânicos pelo ozônio é uma reação seletiva com constante de reação na faixa de $k = 1,0$ a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Normalmente, sob condições ácidas (pH menor que 4), a reação direta predomina e acima do pH 10, a indireta. Em pH 7, ambas reações (direta e indireta) podem ser importantes. O ozônio molecular reage com as ligações insaturadas devido a sua estrutura dipolar, levando a quebra da ligação (Gottschalk *et al.*, 2002).

Materiais orgânicos de diferentes origens reagem diferentemente com o ozônio. Geralmente, o ozônio degrada as substâncias orgânicas levando a formação de moléculas menores, principalmente aldeídos (formaldeídos e acetaldeídos) e ácidos carboxílicos (fórmico, acético, oxálico e pirúvico) que se acumulam na solução devido às suas resistências em reagir com o ozônio. A ozonização aumenta o número de grupos funcionais e a polaridade da molécula (Ternes *et al.*, 2003).

Ozônio reage vagarosamente com alguns compostos que geram sabor e odor como os trihalometanos e benzenos clorados e reage rapidamente com certos tipos de compostos aromáticos, atacando o anel aromático e ocasionando a abertura do anel (Gottschalk *et al.*, 2002; Harrison, 2000). A oxidação de micropoluentes por ozônio é um processo eficiente para compostos que contém grupo amina, anel aromático ou dupla ligação (von Gunten, 2003). O ozônio reage rapidamente com compostos fenólicos em soluções aquosas (Esplugas *et al.*, 2002; Mvula *et al.*, 2001; Huang e Shu, 1995).

Huber *et al.* (2003) mostraram que o grupamento reativo de 17α -etinilestradiol frente ao ozônio ou radical OH é o grupamento fenólico, conforme ocorre para 17β -estradiol, e não o grupo etinil. Na Figura 2.3 são apresentados os locais onde o principal ataque da molécula de ozônio às moléculas de 17α -etinilestradiol e 17β -estradiol pode ser esperado.

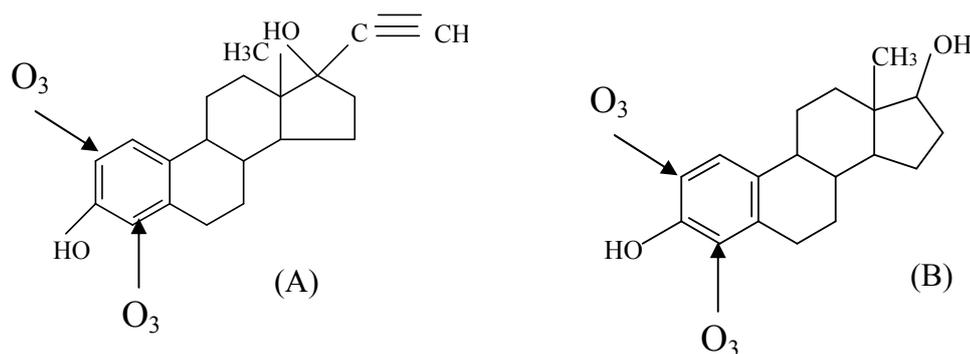


Figura 2.3. Possíveis locais de ataque do O₃ à molécula de (A) 17α-etinilestradiol e (B) 17β-estradiol (Huber *et al.*, 2003).

Diferentes formas dessas substâncias podem estar presentes e serem suscetíveis à oxidação em diferentes valores de pH. O grupo reativo dos estrogênios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol é o grupamento fenólico. No caso do fenol, em pH muito ácido (pH < 4) a concentração de fenolato é desprezível, com isso, a espécie atacada pelos oxidantes seria o fenol. Em pH muito básico (pH > 10), todo fenol estaria na forma de fenolato, que é a espécie mais reativa. Segundo Hoigné e Bader (1983) a constante de taxa de reação do ozônio com o fenolato ($1,4 \pm 0,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) é muito maior do que a constante de taxa de reação do ozônio com o fenol ($1,3 \pm 0,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Deborde *et al.* (2005) avaliaram as constantes de reação entre os estrogênios com o ozônio, onde k_1 representa a reação com o estrogênio e k_2 com a espécie ionizada, mostradas na Tabela 2.25. Verifica-se que as taxas de reação entre o ozônio e as formas dissociadas dos estrogênios são da mesma ordem de grandeza que as taxas de reação do ozônio com o fenolato ($1,4 \pm 0,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Isso indica que o anel fenólico deve ser o principal local de ataque do ozônio. Por outro lado, as taxas de reação entre os estrogênios e o ozônio (k_1) são maiores que as taxas de reação entre o fenol e o ozônio ($1,3 \pm 0,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Isso indica que esses hormônios possuem maior reatividade com o ozônio que o fenol e que, portanto, hormônios que apresentam o anel fenólico possuem maior reatividade com ozônio que outros compostos fenólicos como bisfenol A e nonilfenol.

Tabela 2.25. Constantes de reação entre os estrogênios com o ozônio (Deborde *et al.*, 2005).

Substância	k_1 ($M^{-1} s^{-1}$)	k_2 ($M^{-1} s^{-1}$)
17 β -estradiol	$2,21 \cdot 10^5$	$3,69 \cdot 10^9$
17 α -etinilestradiol	$1,83 \cdot 10^5$	$3,65 \cdot 10^9$
Estrona	$1,53 \cdot 10^5$	$4,24 \cdot 10^9$
Estriol	$1,01 \cdot 10^5$	$3,89 \cdot 10^9$

As reações entre radicais OH ou ozônio molecular com o fenol são bem conhecidas. O radical OH liga-se, preferencialmente, as posições orto (48 %) e para (36 %) do fenol (Mvula e von Sonntag, 2003). Na Figura 2.4 é mostrada a seqüência de reações que ocorrem entre o fenol e o ozônio.

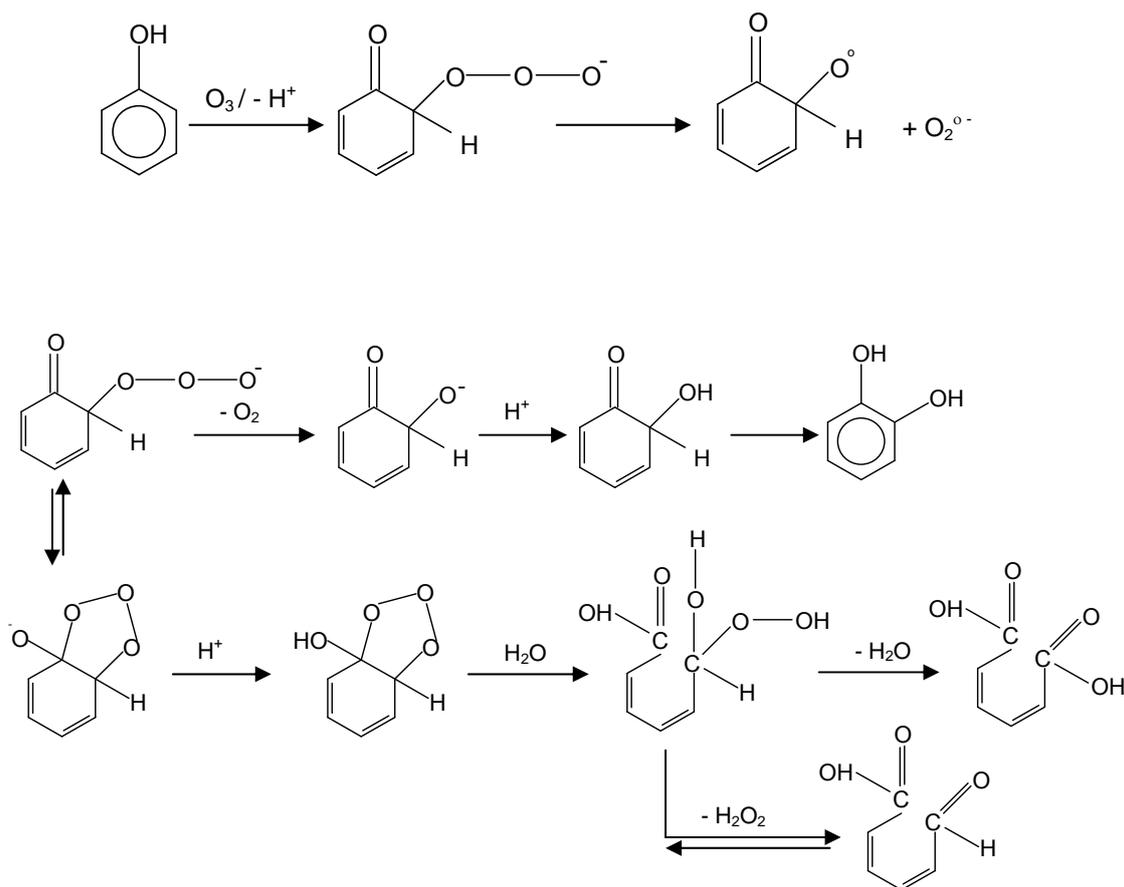


Figura 2.4. Reações entre o ozônio e o fenol, segundo o mecanismo de Mvula e von Sonntag (2003).

Os produtos de oxidação formados durante a ozonização dos hormônios naturais 17 β -estradiol e estrona foram investigados por Huber *et al.* (2004). O 17 β -estradiol e estrona exibem um álcool e um grupo cetona, respectivamente. Como a carbonila e grupos álcoois são muito menos reativos com O₃, esperava-se que o ozônio reagisse somente com o anel fenólico de 17 β -estradiol e estrona. Entretanto, as reações do ozônio com esses dois hormônios resultaram nos mesmos subprodutos, mostrados na Figura 2.5. Com isso, foi possível verificar que o ozônio reage principalmente com o anel fenólico, mas também reage com o grupo álcool de 17 β -estradiol.

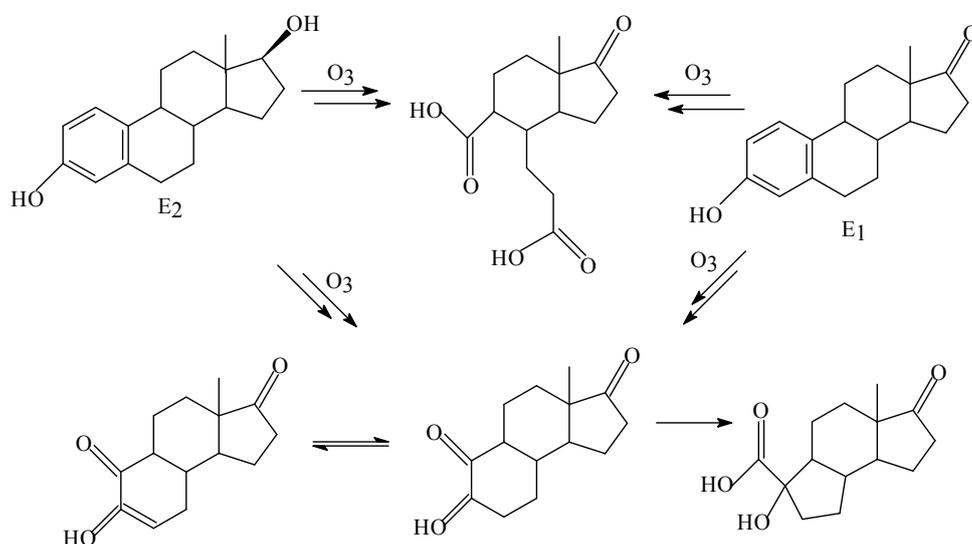


Figura 2.5. Produtos de oxidação formados da reação do ozônio com 17 β -estradiol e estrona (Huber *et al.*, 2004).

Irmak *et al.* (2005) propôs mecanismos para a reação direta do ozônio com o anel fenólico de 17 β -estradiol mostrado na Figura 2.6. A reação do ozônio molecular ou do radical OH em diferentes posições do anel aromático leva a formação de vários intermediários com diversas polaridades. O ataque mais provável da molécula de ozônio ocorre a uma das posições orto do anel aromático de 17 β -estradiol. Observa-se que o ataque pelo ozônio no anel fenólico resulta na sua abertura.

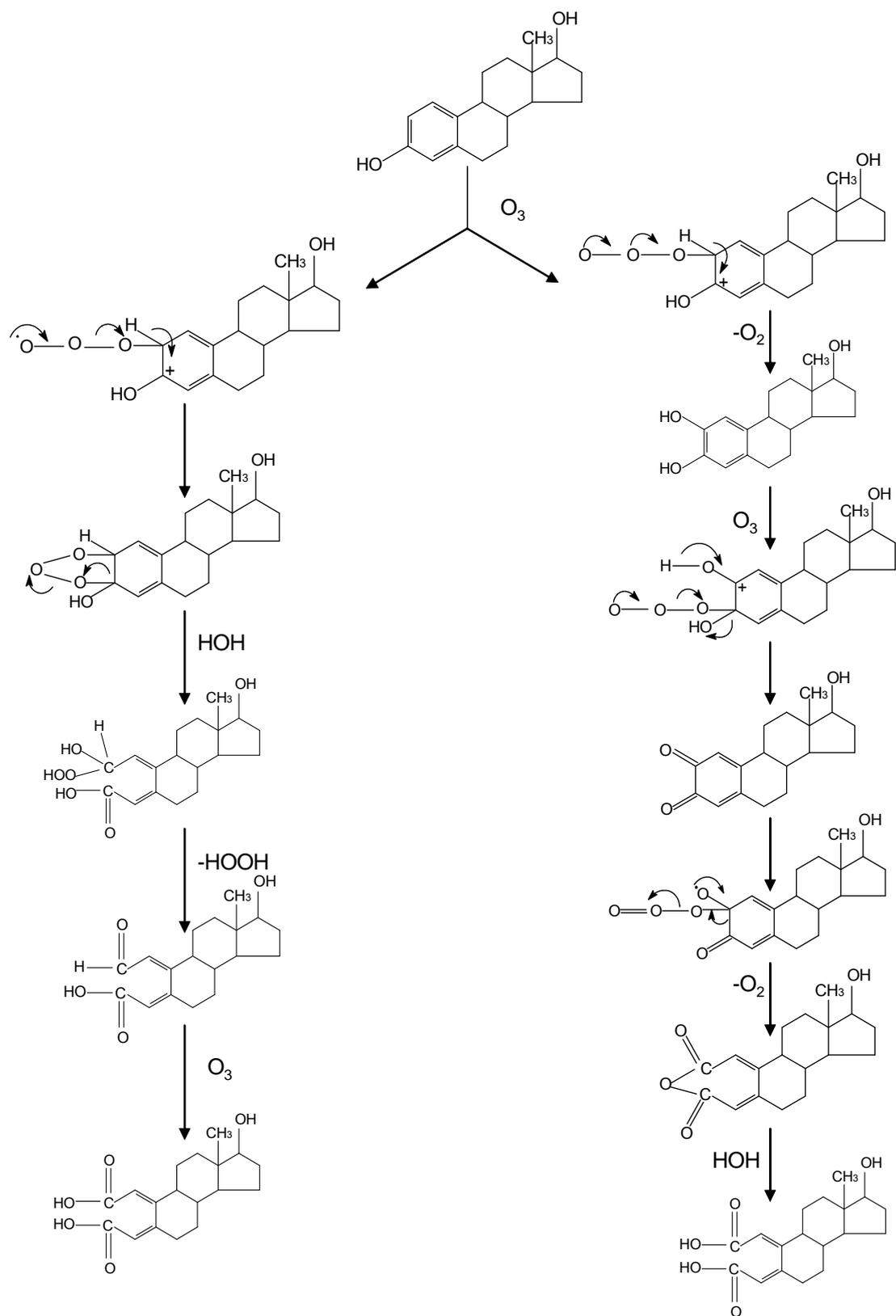


Figura 2.6. Mecanismos da reação direta do ozônio com o anel fenólico de 17 β -estradiol (Irmak *et al.*, 2005).

Ohko *et al.* (2002) propuseram um mecanismo de degradação de 17 β -estradiol por fotocatalise com TiO₂, mostrado na Figura 2.7.

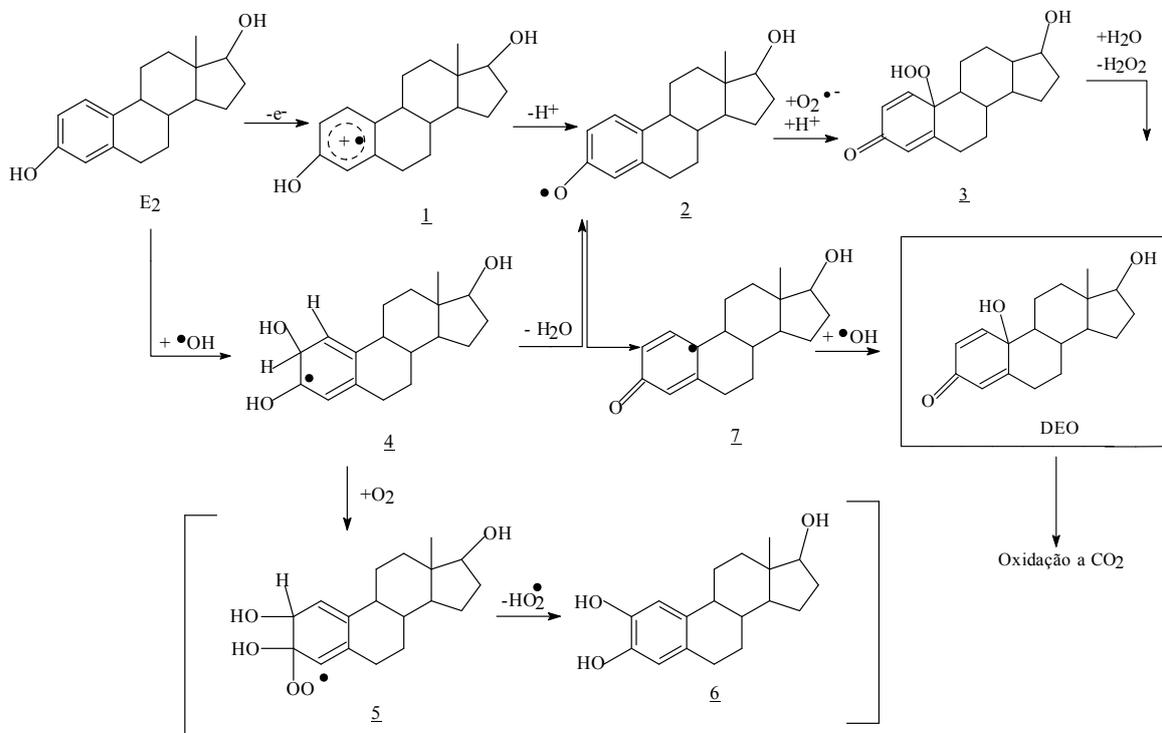


Figura 2.7. Mecanismo de degradação de 17 β -estradiol por fotocatalise com TiO₂ proposto por Ohko *et al.* (2002).

Huber *et al.* (2004) identificaram alguns subprodutos formados na ozonização de 17 α -etinilestradiol. Duas porções da molécula podem ser primeiramente oxidadas pelo ozônio: o anel fenólico de 17 α -etinilestradiol que é altamente reativo com o ozônio ($k_{O_3} = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7) e o grupamento etinil que possui uma menor reatividade ($k_{O_3} = 200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Com base nas taxas de reação, assumiu que as duas porções da molécula de 17 α -etinilestradiol podem ser atacadas pelo ozônio. Para facilitar a identificação dos subprodutos de oxidação, dois compostos modelos foram usados para representar a oxidação dessas duas porções da molécula de 17 α -etinilestradiol: THN (5,6,7,8-tetrahidro-2-naftol) para o grupo fenólico e ECH (1-etinil-1-ciclohexanol). Os mecanismos de reação dos compostos modelos são mostrados nas Figuras 2.8 e 2.9.

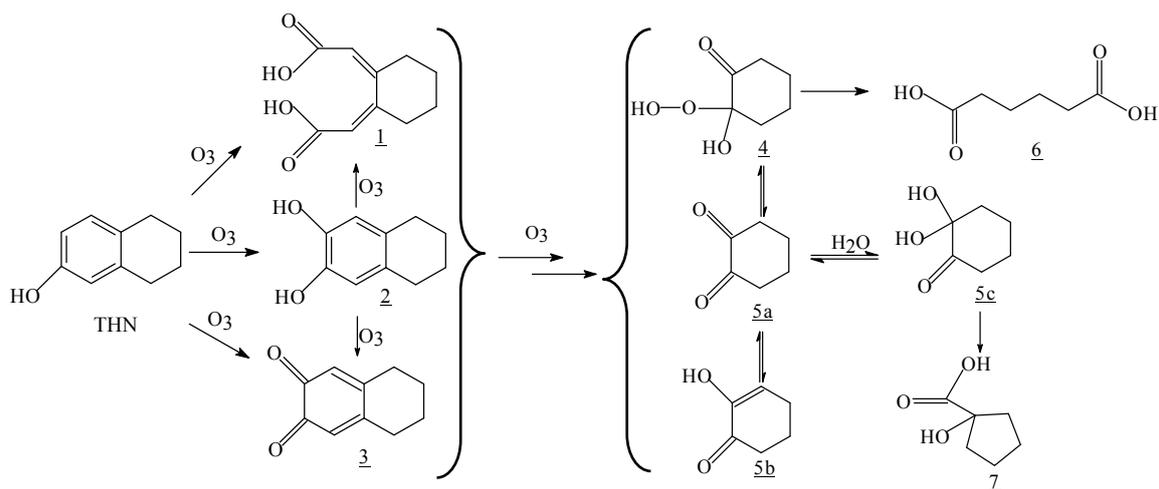


Figura 2.8. Mecanismo de reação para a ozonização do composto modelo THN (Huber *et al.*, 2004).

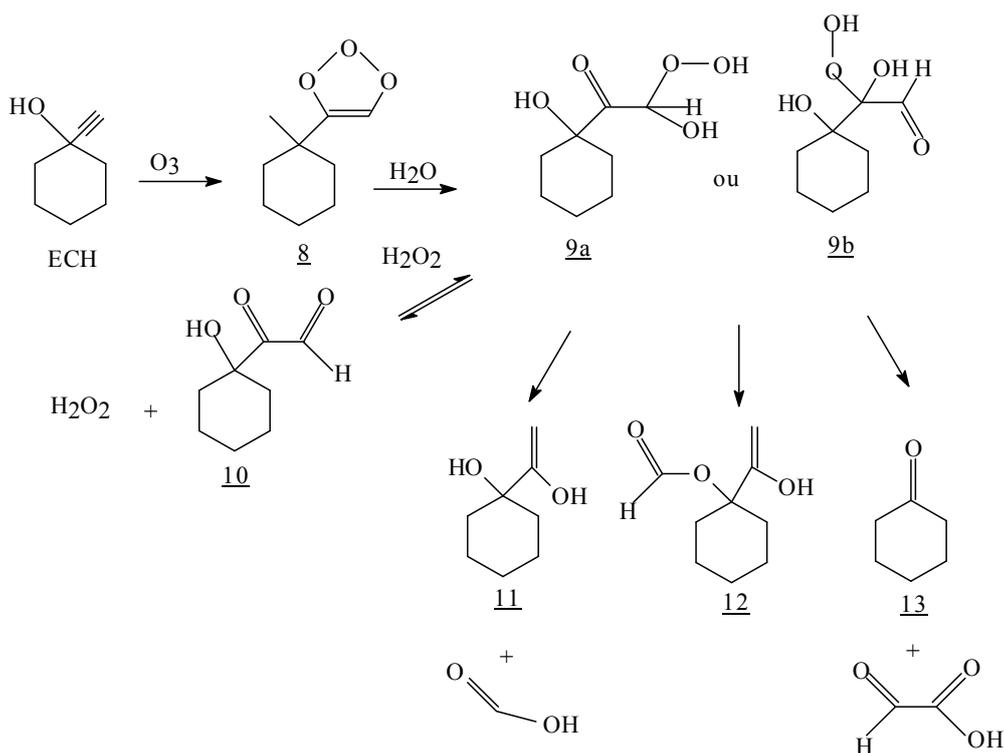


Figura 2.9. Mecanismo de reação para a ozonização do composto modelo ECH (Huber *et al.*, 2004).

O subproduto 6 foi identificado como ácido adípico e comprovado por meio de padrões. O intermediário 7 foi identificado como um ácido carboxílico (1-hidroxi-

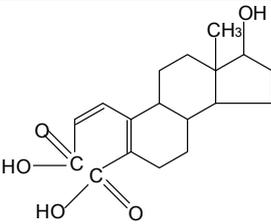
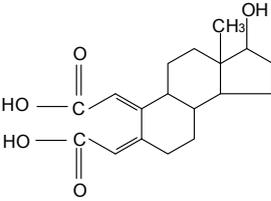
ciclopentano) entretanto não foi encontrado padrão para sua comprovação. As primeiras etapas de reação levam a formação dos intermediários (1), (2) 5,6,7,8-tetrahidro-2,3-naftalenodiol e (3) 2,3-nathfalendione. Esses intermediários são também reativos ao ozônio e conseqüentemente outras reações podem ocorrer, levando a formação de hidroperóxido (4) e/ou 1,2-ciclohexanodione (5a).

2.5. Subprodutos Formados durante a Oxidação de Estrogênios

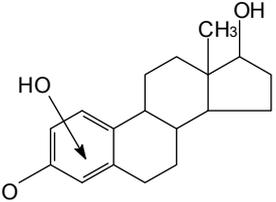
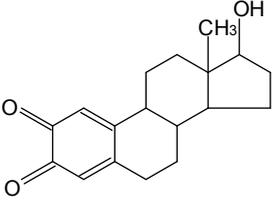
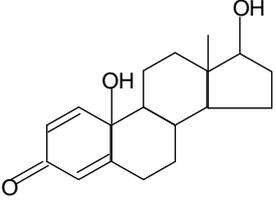
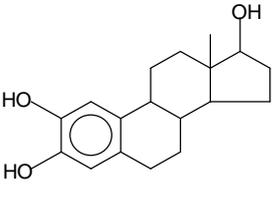
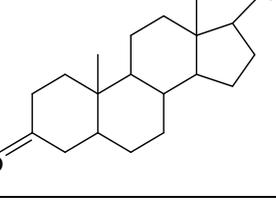
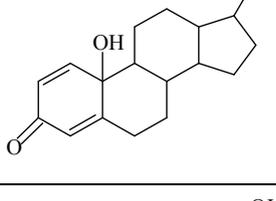
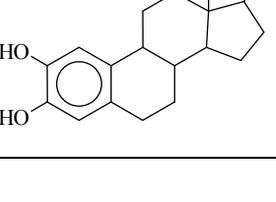
A identificação dos subprodutos formados na oxidação dos estrogênios não é um tópico fácil de estudo, uma vez que, para obtenção dos subprodutos formados, são necessárias técnicas de cromatografia acoplada a espectrometria de massa e muitos desses subprodutos não são comercializados, dificultando a comprovação de sua formação.

Poucos são os trabalhos na literatura onde são propostos esses subprodutos. Para 17 β -estradiol, são encontrados nos trabalhos de Irmak *et al.* (2005), Bila (2005), Huber *et al.* (2004) e Ohko *et al.* (2002) alguns intermediários formados, mostrados na Tabela 2.26, enquanto que para a oxidação de 17 α -etinilestradiol tem-se os intermediários mostrados na Tabela 2.27, propostos por Huber *et al.* (2004).

Tabela 2.26. Intermediários identificados ou propostos para a oxidação de 17 β -estradiol.

Nome do Composto	Estrutura química	Processo de Oxidação	Referência
A		Ozonização O ₃ /UV	Irmak <i>et al.</i> (2005)
B		Ozonização O ₃ /UV	Irmak <i>et al.</i> (2005)

Continuação da Tabela 2.26. Intermediários identificados ou propostos para a oxidação de 17 β -estradiol.

Nome do Composto	Estrutura química	Processo de Oxidação	Referência
C		Ozonização	Irmak <i>et al.</i> (2005)
D		Ozonização O ₃ /UV	Irmak <i>et al.</i> (2005)
10 ϵ -17 β -dihidroxi-1,4-estradieno-3-ona (DEO)		Ozonização	Bila (2005)
2-hidroxiestradiol		Ozonização	Bila (2005)
Testosterona		Ozonização	Bila (2005)
10 ϵ -17 β -dihidroxi-1,4-estradieno-3-ona (DEO)		Fotocatálise	Ohko <i>et al.</i> (2002)
2-hidroxiestradiol		Fotocatálise	Ohko <i>et al.</i> (2002)

Continuação da Tabela 2.26. Intermediários identificados ou propostos para a oxidação de 17 β -estradiol.

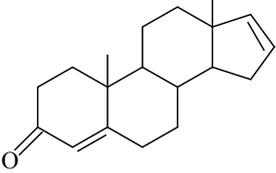
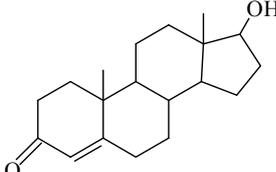
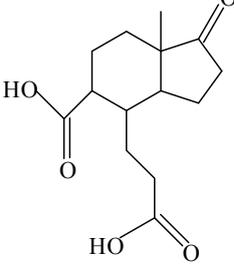
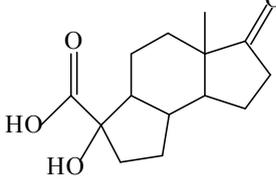
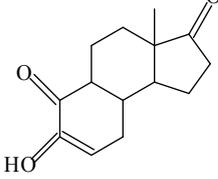
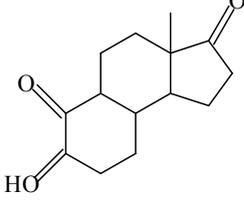
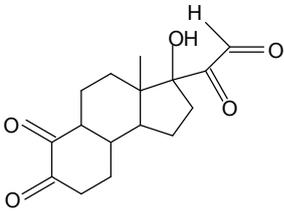
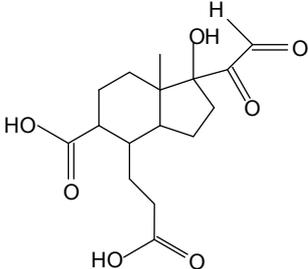
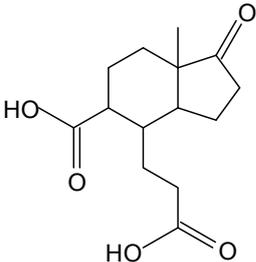
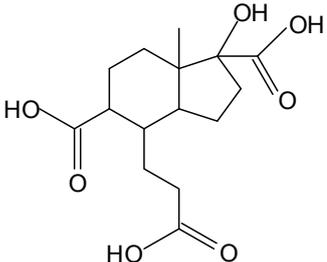
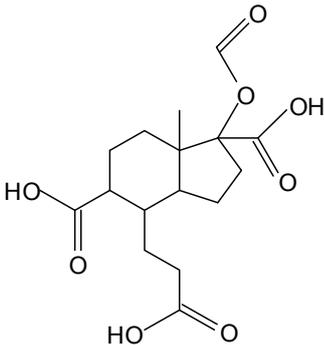
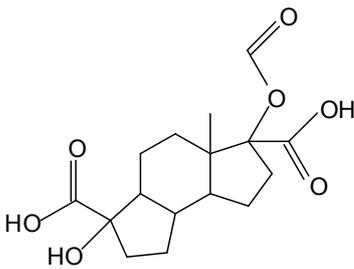
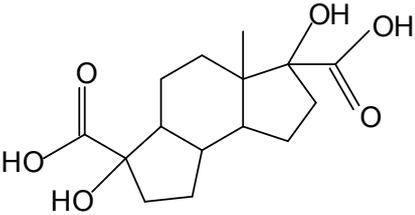
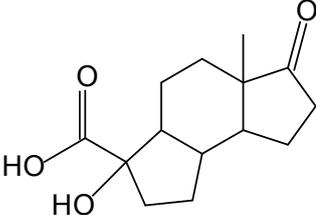
Nome do Composto	Estrutura química	Processo de Oxidação	Referência
Androsta-4,16-dien-3-ona (ADO)		Fotocatálise	Ohko <i>et al.</i> (2002)
Testosterona (TS)		Fotocatálise	Ohko <i>et al.</i> (2002)
-		Ozonização	Huber <i>et al.</i> (2004)
-		Ozonização	Huber <i>et al.</i> (2004)
-		Ozonização	Huber <i>et al.</i> (2004)
-		Ozonização	Huber <i>et al.</i> (2004)

Tabela 2.27. Intermediários propostos para a oxidação de 17α -etinilestradiol (Huber *et al.*, 2004).

Estrutura química	
	
	
	
	

Segundo Irmak *et al.* (2005), o intermediário A foi formado com baixo rendimento pelo processo de O_3/UV e não persistiu por causa de oxidações subseqüentes. Os subprodutos A e B são ácidos dicarboxílicos e foram formados pelo ataque das moléculas de ozônio a duas posições orto do anel fenólico de 17β -estradiol.

O intermediário C foi formado durante os primeiros estágios da aplicação de ozônio. O subproduto D foi uma dicetona formada pela oxidação do anel aromático, sendo que a formação desse intermediário foi reduzida quando comparada com a dos outros intermediários. Foi observado um rendimento mais baixo do intermediário D na ozonização em relação ao processo de O₃/UV.

Bila (2005) observou que o pH influencia na formação dos subprodutos formados na ozonização de 17β-estradiol. Alguns subprodutos propostos nos valores de pH 7 e 11 não foram detectados quando a ozonização foi conduzida em pH 3. Isto indica que diferentes caminhos de reação ocorrem em diferentes valores de pH de ozonização e pode ser explicado devido ao pH 11 favorecer a formação dos radicais OH, que agem como oxidantes, o que já não acontece no pH 3 onde há a maior atuação do ozônio molecular na oxidação dos compostos.

Os subprodutos apresentados na Tabela 2.27 foram formados quando altas concentrações de ozônio (5 a 10 mg l⁻¹ min) foram aplicadas durante a ozonização. Segundo Huber *et al.* (2004), em baixas concentrações de ozônio, esse não reage com o grupo etinil e como consequência, somente o grupamento fenólico é degradado.

2.6. Considerações Finais

Verifica-se, diante da revisão bibliográfica realizada, que não existe um bioensaio e uma técnica química aceitos universalmente para quantificar desreguladores endócrinos presentes no meio ambiente. A análise química de desreguladores endócrinos é sensível e específica, entretanto, é limitada, uma vez que somente as substâncias-alvo são analisadas. Os ensaios *in vitro*, que são baseados na interação entre substâncias estrogênicas e receptores de estrogênicos, podem ser efetivos na determinação da atividade estrogênica total de misturas de substâncias estrogênicas. Conclui-se que, o uso de bioensaios, juntamente com métodos de análise químicos, parece ser a melhor estratégia durante a avaliação da remoção de desreguladores endócrinos de amostras de águas e efluentes.

Com o objetivo de dar continuidade aos trabalhos existentes de degradação de desreguladores endócrinos, esse trabalho possuiu como tema a degradação conjunta dos

estrogênios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol. O presente trabalho tem por objetivo avaliar qual efeito resulta da combinação dessas substâncias estrogênicas, os intermediários formados durante os processos oxidativos, a influência da concentração de ozônio na remoção dos estrogênios e da estrogenicidade, bem como avaliar o efeito do ozônio molecular e do radical hidroxila na remoção da atividade estrogênica. Esses hormônios foram selecionados devido à presença nos efluentes de estações de tratamento de esgoto, à difícil degradação por processos biológicos e ao alto potencial estrogênico dessas substâncias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo é apresentada uma descrição do trabalho experimental desenvolvido, incluindo os reagentes utilizados e as metodologias analíticas empregadas para obtenção das varreduras de UV, das remoções dos estrogênios, da atividade estrogênica e da identificação dos intermediários formados.

3.1. Reagentes

17 β -estradiol (mínimo de 98 %), 17 α -etinilestradiol (mínimo de 98 %), BSTFA, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, Fe₂(SO₄)₃, L-leucina, L-histidina, adenina, L-arginina-HCl, L-metionina, L-tirosina, L-isoleucina, L-lisina-HCl, L-fenilalanina, L-ácido glutâmico, L-valina, L-serina, tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, inositol, D-glucose, ácido aspártico, L-treonina, sulfato de cobre (II) e KOH peletes foram obtidos da Sigma-Aldrich. Biotina e etanol absoluto foram adquiridos da Merck. Hexano, metanol, acetona e terc-butanol da Tedia Brasil. CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) foi adquirido da Roche Diagnostics GmbH.

3.2. Soluções de 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol

Devido à baixa solubilidade de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol em água, foram preparadas as soluções estoque com concentração de 100 mg l⁻¹ de ambas as substâncias em acetona e estocadas a 4°C. As soluções nas concentrações iniciais desejadas para cada experimento foram preparadas a partir da solução estoque e de água Mili-Q ultrapura (livre de matéria orgânica, sais e microorganismos) obtida pelo sistema Rios/Sintesis da Milipore.

3.3. Sistema Experimental

Os testes de ozonização foram realizados em um sistema experimental montado no Laboratório de Controle de Poluição de Águas no PEQ/COPPE constituído de um gerador de ozônio, um analisador de ozônio e uma coluna de contato de vidro com

volume de 1 l (50 cm de altura e 7,0 cm de diâmetro). Na Figura 3.1 é mostrado um esquema do sistema de ozonização, enquanto que na Figura 3.2, uma foto.

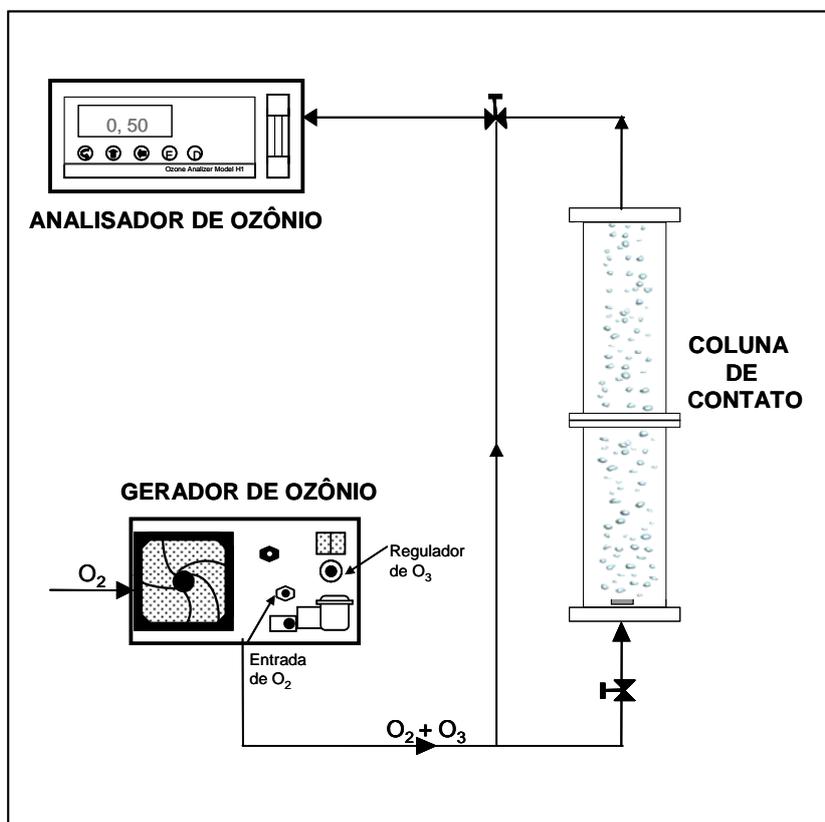


Figura 3.1. Esquema do sistema de ozonização.

O gerador de ozônio Unitek, modelo UTK-O-5B, emprega a tecnologia de descarga corona e foi alimentado com uma mistura de oxigênio e nitrogênio, com o objetivo de se obter a faixa desejada de geração de ozônio. Para medir a concentração de ozônio (% em massa) na fase gás, nas correntes de entrada e de saída da coluna de contato, utilizou-se um analisador de ozônio IN USA, modelo H1, que realiza as medidas por meio de absorção na região do ultravioleta.

A corrente de ozônio foi continuamente introduzida na coluna de contato através de um difusor de vidro sinterizado, localizado na parte inferior da coluna. A geração de ozônio permaneceu na faixa de $6,0$ a $7,5 \text{ mg min}^{-1} \text{ l}^{-1} O_3$. Pela variação do tempo de ozonização, diferentes dosagens de ozônio foram aplicadas.

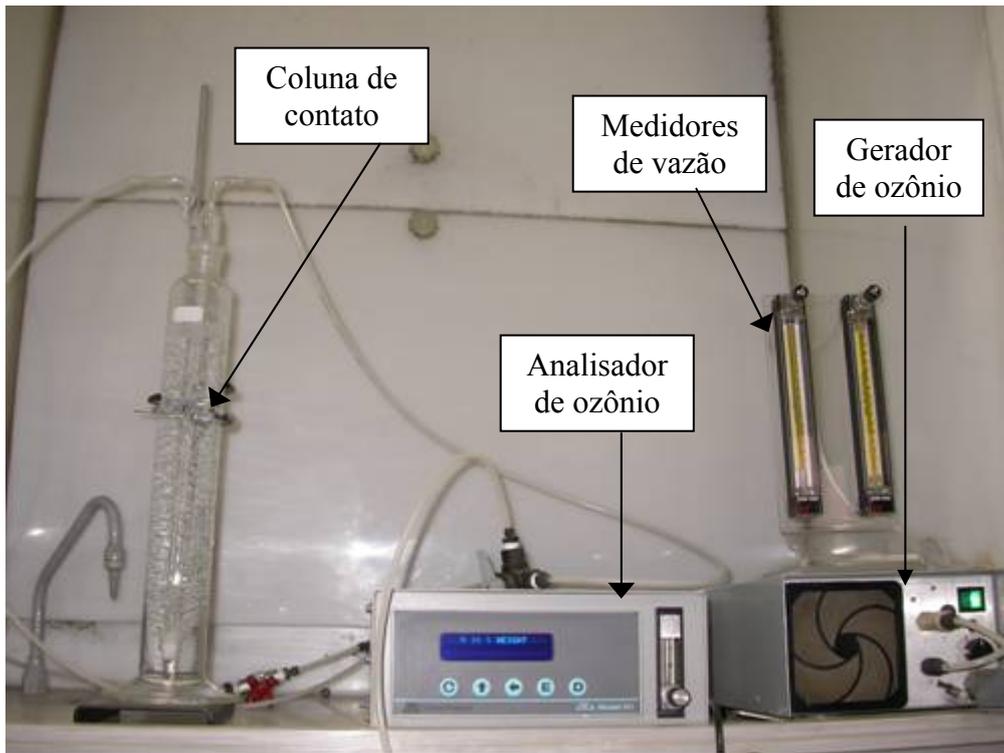


Figura 3.2. Foto do sistema de ozonização.

3.4. Testes de Ozonização

Os testes de ozonização foram realizados em três valores de pH (pH 3, 7 e 11), enquanto que os testes de O_3/H_2O_2 em pH 3 e 7. Para o ajuste do pH foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico ou de hidróxido de sódio em água Mili-Q. A concentração de ozônio consumido variou de 1,0 a 25,0 $mg\ l^{-1} O_3$. Essa concentração corresponde à quantidade de ozônio que foi absorvida pela amostra e resulta da diferença entre a concentração na entrada e na saída da coluna.

Para os testes de degradação e atividade estrogênica foi utilizada uma concentração inicial de 10 $\mu g\ l^{-1}$ para cada estrogênio (quando os estrogênios foram oxidados separadamente) e de 20 $\mu g\ l^{-1}$ para a mistura (10 $\mu g\ l^{-1}$ de cada).

Nos ensaios de O_3/H_2O_2 , o peróxido de hidrogênio foi adicionado à amostra aquosa a ser tratada imediatamente antes da introdução do ozônio. A razão molar O_3/H_2O_2 foi de 2:1.

3.4.1. Testes de Ozonização com Terc-Butanol

Com o objetivo de avaliar a atuação dos radicais OH nos diferentes valores de pH avaliados, tanto para a ozonização quanto para o processo de O_3/H_2O_2 , a oxidação da mistura 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol foi realizada na presença e na ausência de terc-butanol, um capturador de radicais OH. O capturador de radicais OH reage com o radical OH, mas não com o ozônio molecular. A concentração de terc-butanol utilizada foi de 4 mmol l^{-1} e este foi adicionado à amostra aquosa antes da introdução do ozônio.

3.5. Metodologia Analítica

A metodologia analítica utilizada para obtenção da remoção dos estrogênios, avaliação da atividade estrogênica, identificação dos intermediários formados e obtenção das varreduras de UV é mostrada na Figura 3.3.

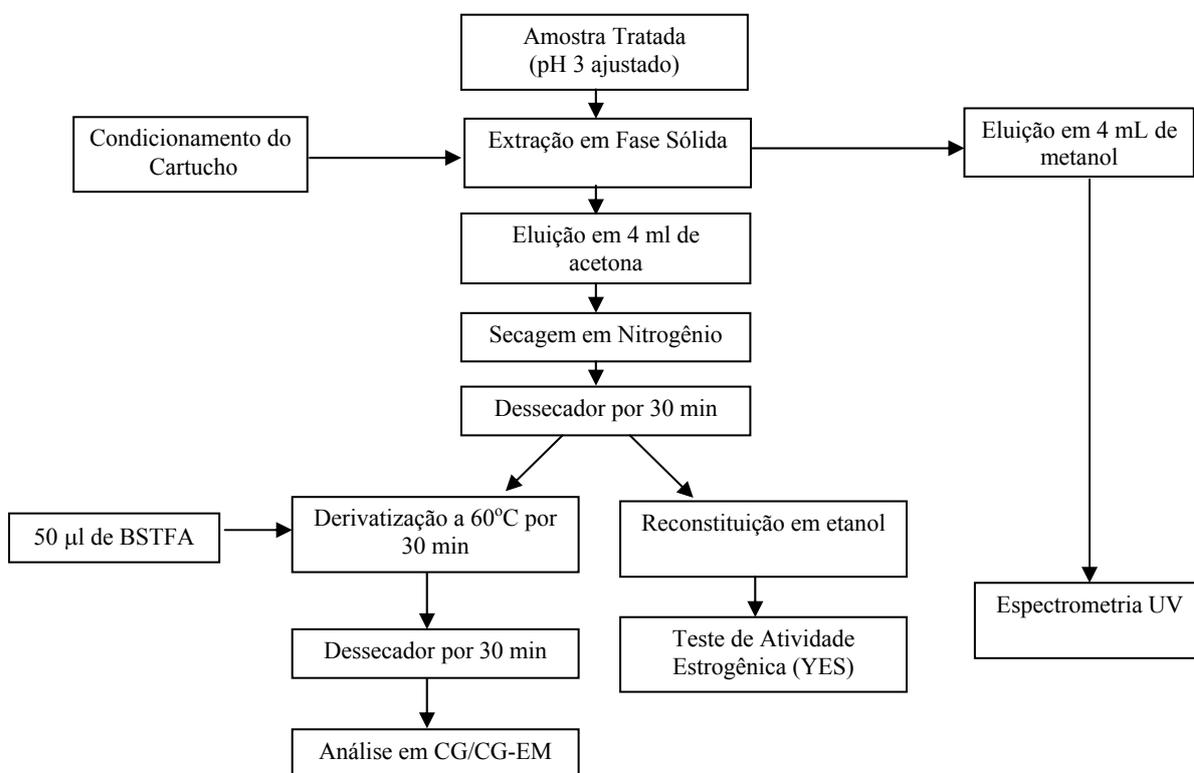


Figura 3.3. Esquema da metodologia analítica utilizada.

3.5.1. Determinação dos Estrogênios em Matrizes Aquosas

Para a determinação dos estrogênios e dos intermediários formados durante os processos oxidativos foi seguida a metodologia analítica que consiste na extração em fase sólida (EFS), derivatização com BSTFA (N,O-bis(trimetil)silil trifluoroacetamida) e detecção por cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM).

3.5.1.1. Extração em Fase Sólida

Para a realização da extração, foram utilizados cartuchos de C₁₈ de 500 mg da Varian com capacidade para 3 ml. Antes dos cartuchos serem utilizados, eles foram condicionados, conforme metodologia apresentada por Bila (2005). O condicionamento foi realizado pela passagem de 3 x 2 ml de hexano, 1 x 2 ml de acetona, 3 x 2 ml de metanol e 5 x 2 ml de água em pH 3. Em seguida, 1 litro da amostra a ser extraída passou pelo cartucho previamente condicionado. Posteriormente, os analitos foram eluídos através da passagem de 2 x 2 ml de acetona, que foi seca com nitrogênio. Os baixos valores de pH das amostras contribuem para a extração eficiente desses estrogênios. A extração foi realizada a uma taxa de 10 ml min⁻¹. Na Figura 3.4 é mostrado o sistema de extração em fase sólida que foi utilizado.

3.5.1.2. Derivatização

Após a evaporação total da acetona, as amostras foram deixadas no dessecador por 30 min. Em seguida, foi realizada a derivatização dos componentes por meio da adição de 50 µl de BSTFA. Posteriormente, as amostras foram deixadas em estufa a 60°C por 30 minutos. Esse procedimento substitui hidrogênios ácidos das moléculas por um grupamento trimetilsilila: -Si(CH₃)₃. Após a derivatização, as amostras foram novamente deixadas no dessecador por 30 min (Bila, 2005).

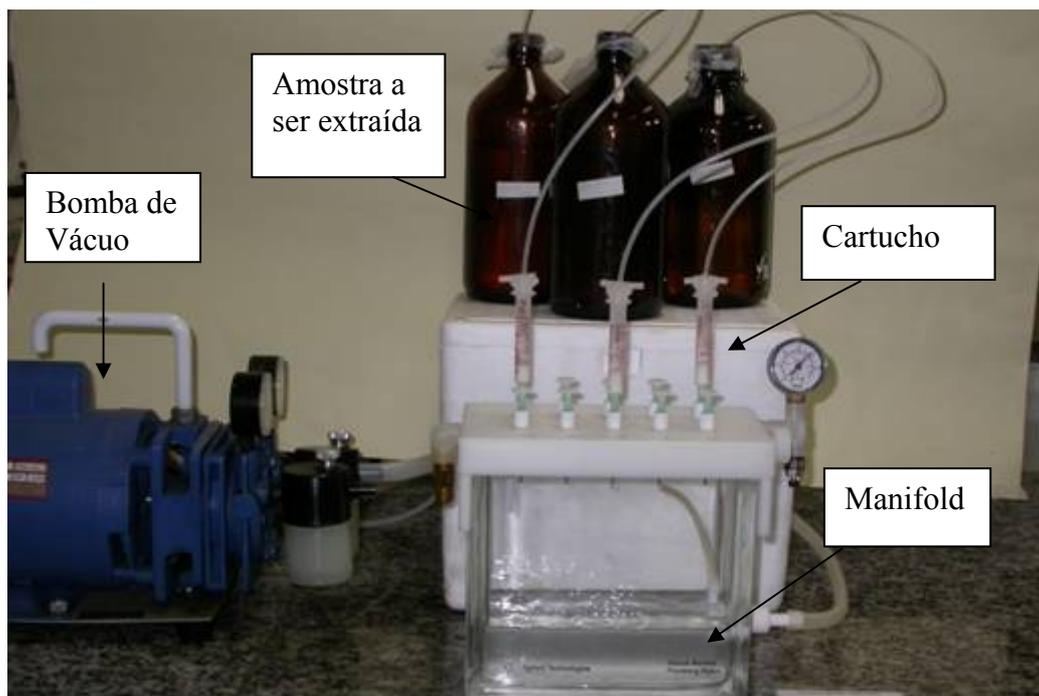


Figura 3.4. Sistema de extração em fase sólida.

3.5.1.3. Cromatografia Gasosa

Após a derivatização, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo gasoso GC-17A-Shimadzu com detector por ionização em chama (DIC), com o objetivo de avaliar a quantidade de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol que permaneceram na amostra, por meio da comparação das áreas dos picos dos cromatogramas das amostras ozonizadas com os das amostras padrões.

A coluna utilizada foi a Factor Four – 5MS da Varian com diâmetro interno de 0,25 mm, comprimento de 30 m e espessura de fase de 0,25 μ m. Uma lacuna de retenção da Varian, com diâmetro interno de 0,25 mm e comprimento de 2,5 m, foi conectada antes da coluna a fim de viabilizar a análise em modo Splitless. As condições cromatográficas de análise das amostras são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições cromatográficas utilizadas.

Programação de Temperatura	Parâmetros	Taxa (°C min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
	T _{injetor}	—	280	—
	T _{detector}	—	320	—
	T _{coluna}	—	130	—
		10	230	2
		2	260	2
		10	300	2
	Tempo Total			35
Programação de Pressão	Parâmetro	Taxa (kPa min ⁻¹)	Pressão (kPa)	Tempo (min)
	P _{coluna}	—	107	—
		3,3	140	2
		0,7	150	2
		3,0	162	2
Gás de arraste	Hidrogênio			
Vazão - Gás de Arraste	2,0 ml min ⁻¹			
Velocidade Linear - Gás de arraste	56 cm s ⁻¹			
Volume de Injeção	0,6 µl			
Tempo de Amostragem	1,0 min			
Modo de injeção	Splitless			

3.5.1.4. Avaliação da Recuperação no Processo de Extração e Limite de Quantificação da Metodologia

A avaliação da recuperação de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol no processo de extração foi realizada por meio da comparação das áreas dos picos cromatográficos, obtidas pelo cromatógrafo gasoso, das amostras preparadas a partir da solução estoque

com diluições em acetona com das amostras extraídas em cartucho de C₁₈. Foi verificado que a recuperação dos estrogênios no cartucho foi bastante alta, superior a 90%, conforme também obtido por Bila (2005). Os limites de quantificação de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol foram de 5 ng l⁻¹.

3.5.1.5. Identificação dos Produtos e Intermediários

Os produtos e intermediários formados durante o processo de ozonização foram identificados por meio de análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, que foram realizadas no Instituto de Química da UFRJ. As bibliotecas utilizadas na identificação dos subprodutos formados foram Nist e Wiley 275.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo HP 5890, series II, acoplado a Espectrômetro de Massas HP 5972, no modo de varredura, entre 45 e 600 Da, utilizando-se a mesma coluna Factor Four 5-MS da Varian descrita anteriormente. Na Tabela 3.2 são apresentadas as condições de análise utilizadas no sistema CG/EM. Essas condições foram utilizadas no trabalho de Bila (2005) para análise dos subprodutos formados durante a ozonização de 17β-estradiol.

Para a determinação dos intermediários foi utilizada uma concentração de 1 mg l⁻¹ de cada substância. Essa maior concentração foi utilizada para facilitar a identificação dos subprodutos formados durante a ozonização.

Na Figura 3.5 é mostrado um fluxograma do processo descrito para a determinação dos estrogênios e identificação dos subprodutos formados durante a ozonização.

Tabela 3.2. Condições de análise do sistema de CG/EM utilizadas.

	Parâmetros	Taxa (°C min⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Programação de Temperatura	T _{injetor}	—	290	—
	T _{detector}	—	300	—
	T _{coluna}	—	50	—
		30	150	—
		10	300	5
Gás de Arraste	Hélio			
Vazão do Gás de Arraste	1,22 ml min ⁻¹			
Velocidade Linear do Gás de arraste	40 cm s ⁻¹			
Volume de Injeção	1,0 µl			
Pressão na Coluna	65 kPa			
Modo de injeção	Splitless			

3.5.2. Análise de Carbono Orgânico Dissolvido

A concentração de carbono orgânico dissolvido foi determinada utilizando-se um Analisador de Carbono Orgânico Total (COT), marca Shimadzu, modelo 5000A. O princípio do método para dosagem de carbono total é baseado na combustão da amostra a temperatura elevada (680°C), sendo avaliada a quantidade de CO₂ formada, conforme padronização realizada pela AWWA (APHA, 2005).

Para a realização dessas análises de COD em baixas concentrações (da ordem de µg l⁻¹), foi necessário fazer a preparação do equipamento, por meio de troca do catalisador e de limpezas consecutivas, com água Mili-Q, por aproximadamente 15 dias, com o objetivo de remover traços de outras substâncias encontradas no sistema.

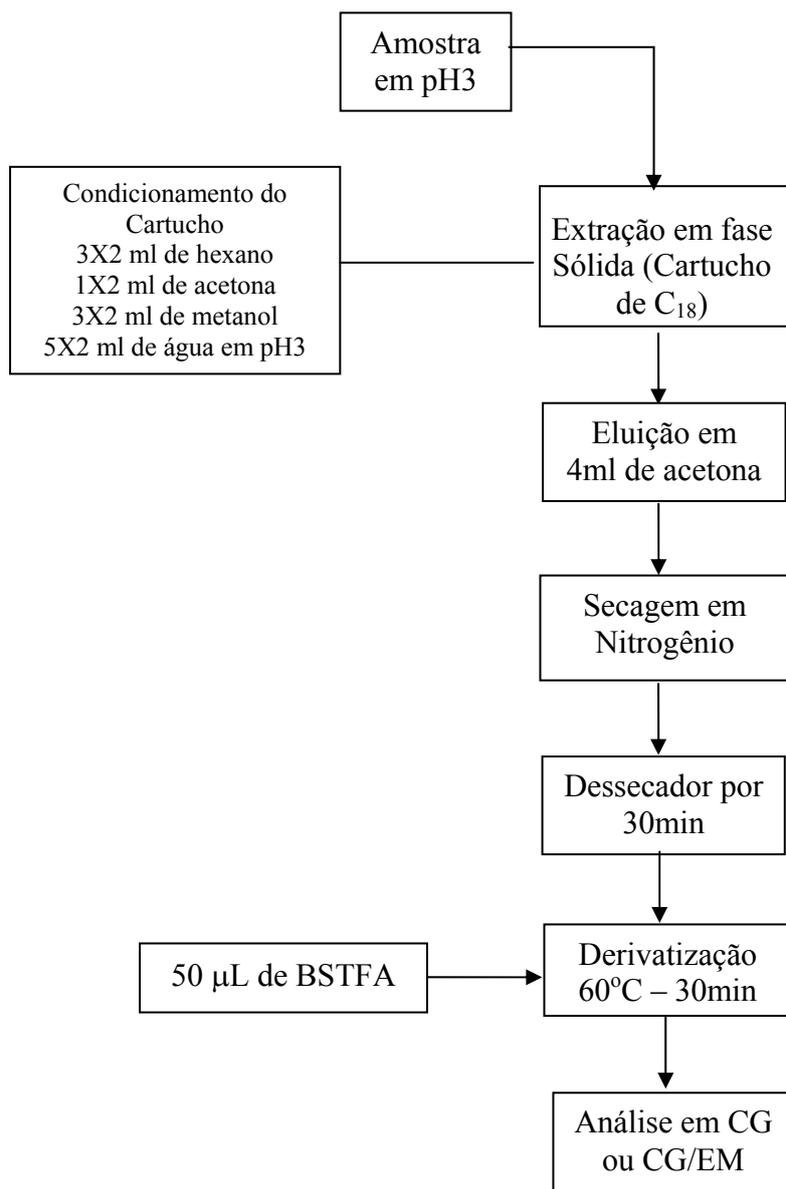


Figura 3.5. Fluxograma da metodologia analítica utilizada para obtenção da remoção dos estrogênios e identificação dos subprodutos formados.

A análise de carbono orgânico foi muito trabalhosa, uma vez que os estrogênios são insolúveis em água e apenas solúveis em solventes orgânicos. Isso dificultou muito o trabalho, uma vez que, para solubilizar os estrogênios, principalmente 17α -etinilestradiol, foi utilizada uma pequena quantidade de acetona. Entretanto, a quantidade de carbono orgânico presente na acetona é muito maior que a presente nos estrogênios.

Portanto, a partir de análises teóricas, obtidas através da fórmula molecular dos estrogênios e da acetona, e experimentais, realizadas no Analisador de Carbono Orgânico Total, foi verificado que o equipamento estava medindo praticamente o carbono orgânico presente na acetona, uma vez que a quantidade presente na acetona era muito superior à presente nos estrogênios.

Diante disso, foi desenvolvida uma metodologia com o objetivo de tornar possível a análise. Para isso, optou-se por colocar uma fração da solução concentrada de 100 mg l⁻¹ de 17β-estradiol e da solução concentrada de 100 mg l⁻¹ de 17α-etinilestradiol em um balão volumétrico. Deixou-se a acetona existente no balão secar com nitrogênio e preparou-se a solução da mistura 17β-estradiol/17α-etinilestradiol com concentração de 200 µg l⁻¹ de cada estrogênio, por meio da adição de água Mili-Q.

Após a ozonização dessas amostras, que foi realizada em pH 7, foi determinada a concentração de carbono orgânico dissolvido. A análise de COD foi realizada sem tratamento prévio. Essa análise teve por objetivo avaliar a mineralização dos estrogênios, ou seja, a transformação do carbono orgânico em CO₂ e água.

3.6. Teste de Atividade Estrogênica

Os testes de atividade estrogênica foram realizados segundo o método proposto por Routledge e Sumpter (1996) - método YES (“Yeast Estrogen Screen”) para análise *in vitro*, utilizando uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente. Este ensaio permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de interagir com o receptor de estrogênio humano e elucidar uma resposta estrogênica.

3.6.1. Cepa de levedura recombinante

Uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente foi desenvolvida pelo Departamento Genético da Glaxo, para ser utilizada no teste, com o objetivo de identificar componentes que podem interagir com o receptor de estrogênio humano (REh).

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no ensaio YES foi doada pelo Prof. J. P. Sumpter da Universidade de Brunel, Uxbrige, UK. A cepa de levedura foi mantida no laboratório em temperatura ambiente (25°C) e repicada para ser utilizada nos ensaios. Algumas amostras da cepa foram conservadas em um meio com 15 % de glicerol a -4°C, por até quatro meses.

As células de leveduras normalmente não contêm um receptor de estrogênio. Então, a seqüência de DNA do REh foi integrada no principal cromossomo da levedura. A ligação do estrogênio ao receptor causa expressão do gene receptor da Lac-Z e a enzima β -galactosidase é sintetizada e excretada ao meio, onde metaboliza o substrato cromogênico CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) que é normalmente amarelo em um produto vermelho. A mudança de coloração pode ser medida por absorbância a 540 nm. Um esquema do sistema de expressão do estrogênio na levedura é apresentado na Figura 3.6.

3.6.2. Preparação das Soluções

O meio mínimo (pH 7,1) foi preparado pela adição de 13,61 g de KH_2PO_4 , 1,98 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,2 g de KOH peletes, 0,2 g de MgSO_4 , 1 ml de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40 mg/50 ml H_2O), 50 mg de L-leucina, 50 mg de L-histidina, 50 mg de adenina, 20 mg de L-arginina-HCl, 20 mg de L-metionina, 30 mg de L-tirosina, 30 mg de L-isoleucina, 30 mg de L-lisina-HCl, 25 mg de L-fenilalanina, 100 mg de L-ácido glutâmico, 150 mg de L-valina e 375 mg L-serina em 1 l de água mili-Q. A solução foi armazenada em frascos de vidro, esterilizada a 121°C por 20 min e armazenada a temperatura ambiente.

A solução de vitamina foi preparada adicionando-se 8 mg de tiamina, 8 mg de piridoxina, 8 mg de pantetonato de cálcio, 40 mg de inositol e 20 ml de solução de biotina (2 mg/100 ml H_2O) em 180 ml de água mili-Q. A solução foi filtrada e esterilizada em membrana de 0,2 μm estéril e estocada a 4°C em frascos esterilizados.

Símbolos

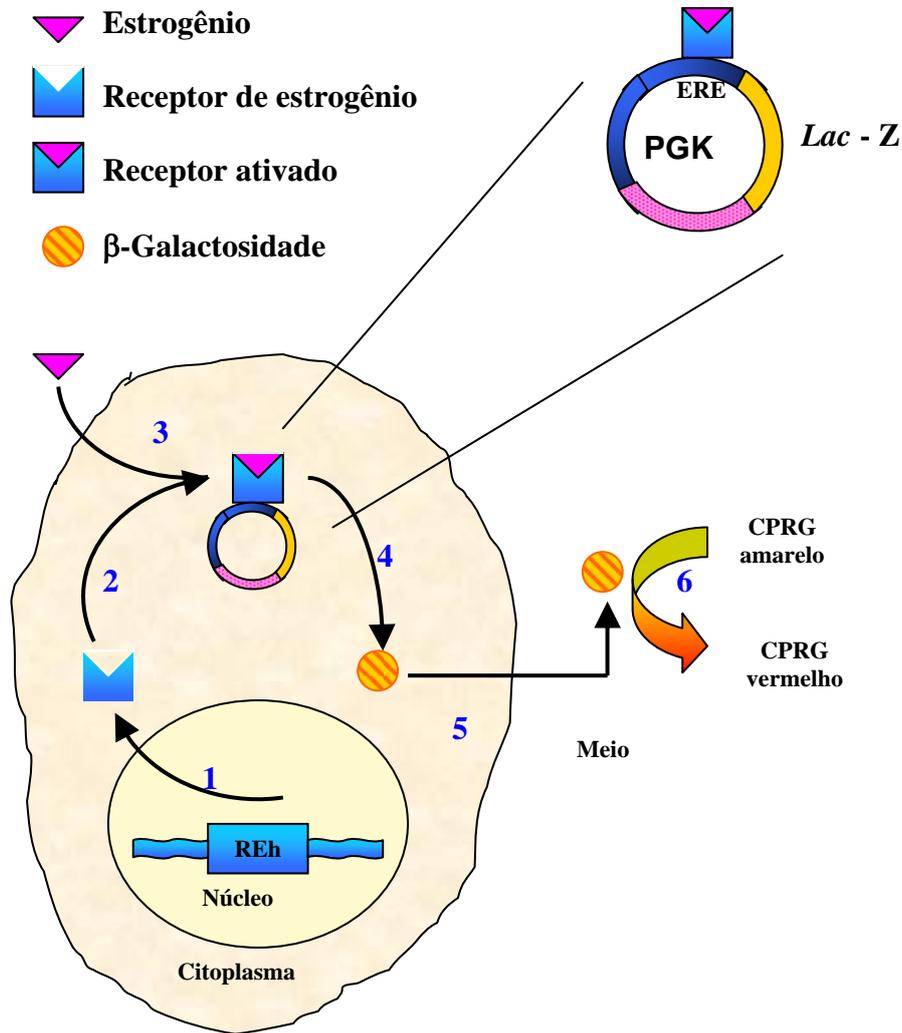


Figura 3.6. Esquema do sistema de expressão do estrogênio na levedura. Em (1) o gene receptor de estrogênio humano é integrado no genoma principal, sendo capaz de ligar-se aos estrogênios. Em (2) ocorre a ativação do receptor (3) pela ligação do estrogênio, causando expressão do gene receptor da Lac-Z (4) o qual produz a enzima β -galactosidase. Esta enzima é excretada no meio (5) e metaboliza o substrato cromogênico CPRG (normalmente amarelo) em um produto vermelho (6) e essa mudança de coloração pode ser medida pela absorbância (Figura de Bila, 2005).

Uma solução de 20 % m/v de glucose foi esterilizada em alíquotas a 121°C, por 10 min, e armazenada em temperatura ambiente. Uma solução estoque de 4 mg/ml de ácido aspártico foi esterilizada em alíquotas a 121°C por 10 min e armazenada a temperatura ambiente. Uma solução estoque de 24 mg/ml de L-treonina foi esterilizada em alíquotas a 121°C por 10 min e armazenada a 4°C.

Uma solução de 20 mmol l⁻¹ (0,5 g/100 ml) de sulfato de cobre (II) foi preparada, filtrada e esterilizada em membrana de 0,2 µm estéril. A solução foi armazenada a temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados. Uma solução estoque de CPRG de 10 mg/ml de H₂O foi preparada em água mili-Q esterilizada e armazenada a 4°C em frasco de vidro esterilizado e coberto para evitar a passagem de luz.

3.6.3. Preparação do Meio de Cultivo

O meio de cultivo foi preparado em frasco estéril pela adição de 5 ml de solução de glucose, 1,25 ml de solução de ácido L-aspartico, 0,5 ml de solução de vitamina, 0,4 ml de solução de L-treonina e 125 µl de solução de sulfato de cobre (II) para 45 ml de meio mínimo. Esse meio foi armazenado a temperatura ambiente e utilizado por, no máximo, uma semana.

3.6.4. Propagação da Levedura

A propagação da levedura foi realizada por meio da inoculação de 10 ml de meio de cultivo com 100 µl de solução estoque de levedura em um frasco T estéril com 25 cm². Deixou-se na incubadora a 30°C e 100 rpm por 24 h em um agitador orbital Modelo N° G 24, New Brunswick Scientific.

3.6.5. Preparação do Meio de Análise

O meio de análise foi preparado adicionando-se 250 µl do substrato cromogênico CPRG em 25 ml do meio de cultivo. O meio foi inoculado com aproximadamente 4 x 10⁷ células de levedura, ou seja, aproximadamente 25 µl da mistura de 4 ml de meio de cultivo com 1 ml da levedura inoculada 24 h antes do teste.

3.6.6. Preparação das Amostras

Para a realização destas análises, as amostras oxidadas foram extraídas em cartucho C₁₈, conforme procedimento descrito anteriormente, ítem 3.4.2.1., eluídas em 4,0 ml de acetona e após a acetona ter sido totalmente seca, as amostras foram reconstituídas em 2,0 ml de etanol absoluto e estocadas a 4°C até serem usadas no teste YES, conforme método descrito por Bila (2005). Na Figura 3.7 é mostrado o fluxograma o processo descrito.

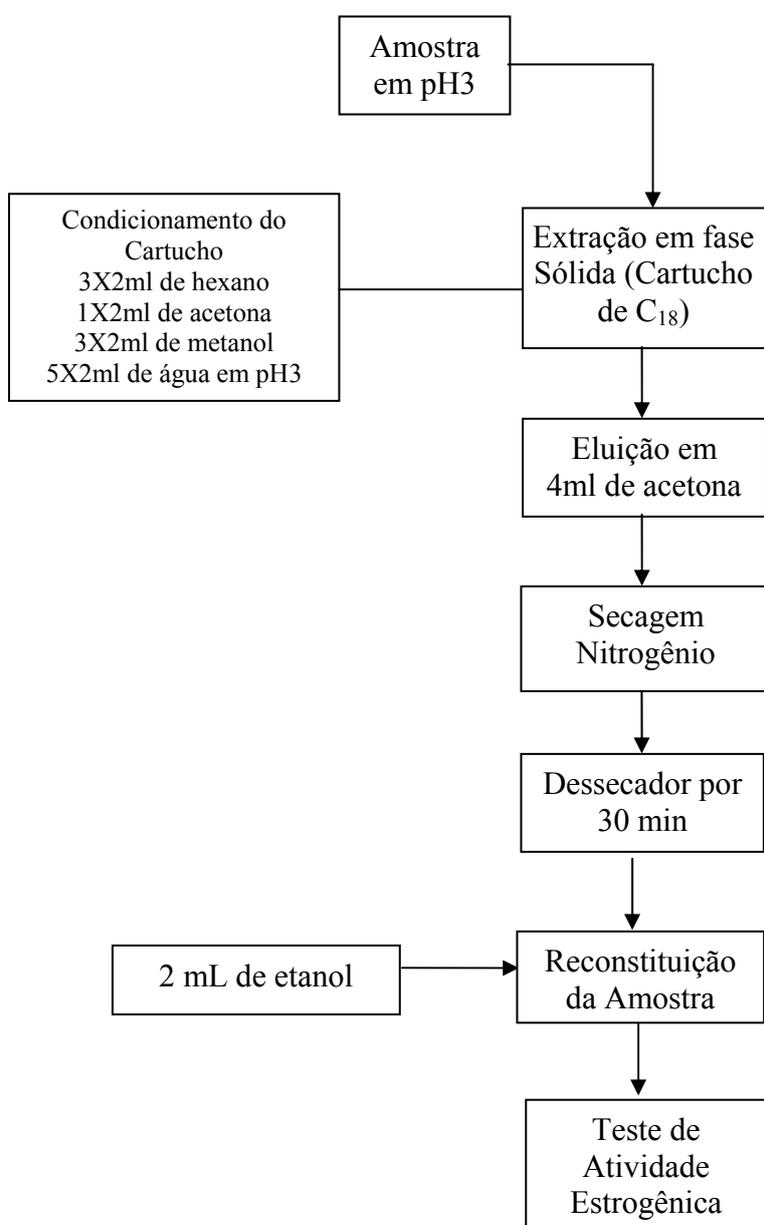


Figura 3.7. Fluxograma da metodologia utilizada nos testes de atividade estrogênica.

3.6.7. Procedimento de Análise

O ensaio de atividade estrogênica foi realizado segundo o método descrito por Coleman *et al.* (2004) e Routledge e Sumpter (1996), com algumas modificações. Foram utilizadas microplacas de 96 poços estéreis e as análises foram realizadas em capela de fluxo laminar.

Primeiramente foram feitas as diluições consecutivas das amostras tratadas e de 17β -estradiol em uma placa de 96 poços mostrada na Figura 3.8. A diluição de 17β -estradiol permitiu que os testes de atividade estrogênica fossem realizados na faixa de concentração de $2,72 \mu\text{g l}^{-1}$ a $1,33 \text{ ng l}^{-1}$, sendo que essa faixa refere-se à concentração dentro do poço da placa.

Em seguida, transferiu-se $10 \mu\text{l}$ de cada poço da placa de diluição para cada poço da placa de análise. Deixou-se o etanol evaporar e adicionou-se $200 \mu\text{l}$ de meio de análise em cada poço da placa de ensaio. A placa foi lacrada com fita, agitada vigorosamente por 5 min em um agitador (modelo Certomat II, B. Braun Biotech International) e colocada em incubadora a 30°C por 72 h (Quimis - Q-316M2).



Figura 3.8. Placa utilizada nos testes de atividade estrogênica.

O esquema do procedimento de análise é mostrado na Figura 3.9. Em cada placa foram colocadas duas fileiras para cada amostra (foram feitas duplicatas para cada teste), intercaladas com branco ($200 \mu\text{l}$ de meio de análise com solvente) e duas fileiras contendo diluições consecutivas de 17β -estradiol (padrão utilizado para comparação).

Depois de 72 h (3 dias de incubação), as placas foram agitadas por 5 min em um agitador (modelo Certomat II, B. Braun Biotech International), permaneceram em repouso por 1 h e depois foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm (para cor) e a 620 nm (para turbidez) em uma leitora de placas (Bio-Tek EL808). Na Equação 3.1 é mostrada a correção que foi feita na absorbância medida, a fim de eliminar o efeito do crescimento da levedura.

$$A_{corrAmostra} = A_{540Amostra} - (A_{620Amostra} - A_{620Branco}) \quad (3.1)$$

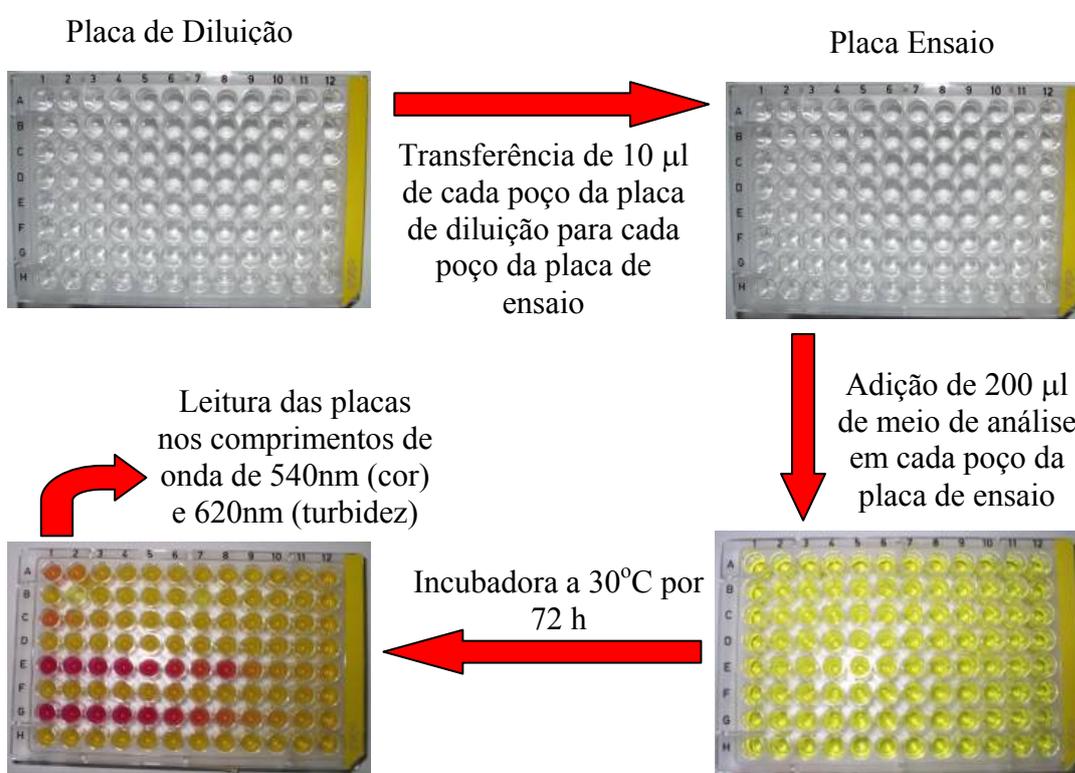


Figura 3.9. Esquema do procedimento de análise do teste YES.

Os resultados de atividade estrogênica foram representados por curvas dose-resposta dos valores de absorbância corrigidos em função da concentração de 17β-estradiol (curva padrão do ensaio YES – resposta positiva) e em função do fator de diluição para os extratos das amostras ozonizadas serialmente diluídas. As curvas dose-

resposta de 17 β -estradiol foram produzidas na faixa de concentração de 2,72 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 1,33 ng l^{-1} . Para cada teste realizado, foi feita uma curva dose-resposta.

Os extratos das amostras originais de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol com concentração de 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ em solução aquosa apresentaria concentração de 5000 $\mu\text{g l}^{-1}$ no extrato, uma vez que, para o teste de atividade estrogênica, as amostras foram concentradas 500 vezes durante a extração em fase sólida (de 1000 ml para 2 ml). Pela curva dose-resposta de 17 β -estradiol obtida pelo ensaio YES, a máxima resposta estrogênica se dá com uma concentração de 2,72 $\mu\text{g l}^{-1}$. Portanto, as amostras tiveram que ser diluídas para poderem ser medidas no ensaio.

A atividade estrogênica das amostras oxidadas pode ser expressa como equivalentes de 17 β -estradiol. O EQ-E₂ (equivalente de 17 β -estradiol) é definido como a concentração de 17 β -estradiol que elucida a mesma resposta da amostra oxidada, no ensaio YES.

Os valores de CE₅₀ (concentração que elucida 50 % da atividade) foram obtidos por meio de regressão sigmoideal não linear (Routledge e Sumpter, 1996). Na Equação 3.2 é mostrada a equação do ajuste sigmoideal.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (3.2)$$

sendo que, y corresponde ao valor de $A_{\text{corrAmostra}}$, A_1 é o limite de detecção, A_2 é a máxima indução da atividade estrogênica, x é a concentração da substância estrogênica no ensaio, x_0 é o valor de CE₅₀ e p é a inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta.

Com o intuito de comparar o potencial estrogênico de 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol, foi determinada a potência estrogênica relativa (PR), calculada a partir da Equação 3.3, para cada substância em relação a 17 β -estradiol.

$$PR = \frac{CE_{50_{17\beta\text{-estradiol}}}}{CE_{50_{\text{amostra}}}} \quad (3.3)$$

3.7. Espectrometria de UV

As varreduras de UV foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV Mini-1240. As varreduras das amostras ozonizadas de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol (concentração inicial de 50 $\mu\text{g l}^{-1}$) foram realizadas na faixa de 190 a 300 nm. A dosagem de ozônio aplicada variou de 6,0 a 8,0 $\text{mg min}^{-1} \text{l}^{-1} \text{O}_3$.

A metodologia analítica empregada na preparação das amostras consistiu na extração em fase sólida, na qual os cartuchos foram condicionados pela passagem 4 x 2 ml de metanol e 5 x 2 ml de água em pH 3. Após o condicionamento, 1 l de amostra ozonizada passou pelo cartucho a uma taxa de 10 ml min^{-1} . Os analitos retidos no cartucho foram eluídos com 2 x 2 ml de metanol. Essa solução foi analisada no espectrofotômetro. A metodologia é mostrada na Figura 3.10.

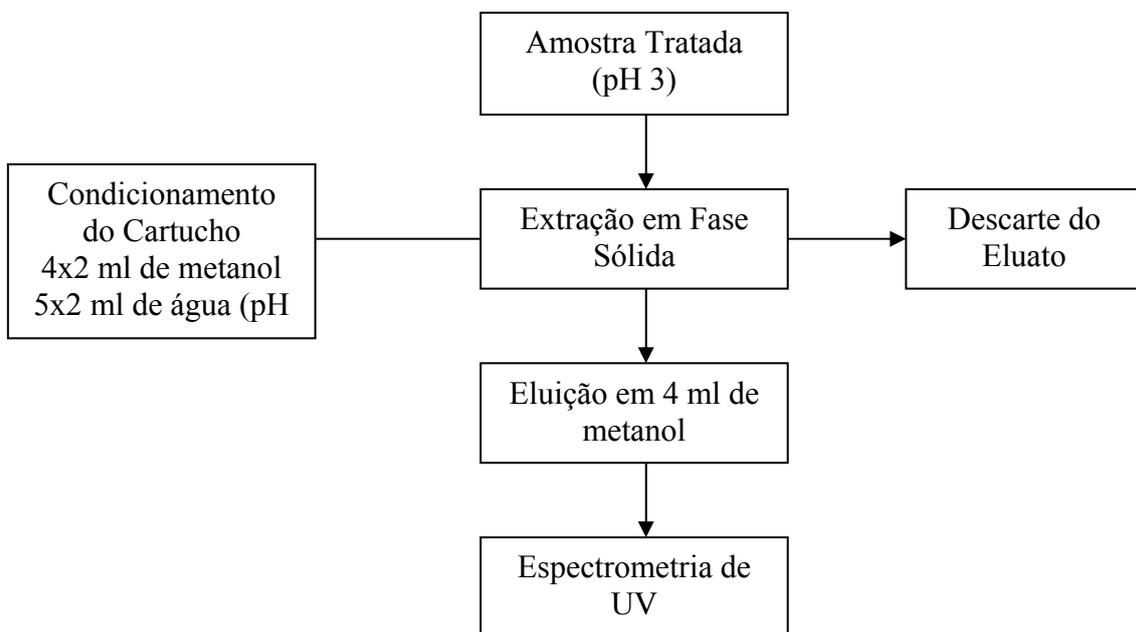


Figura 3.10. Metodologia para Espectrometria de UV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As avaliações das remoções dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, assim como da atividade estrogênica são muito importantes, pois concentrações da ordem de ng l⁻¹ são prejudiciais aos peixes. Outro tópico de grande relevância no estudo da degradação dessas substâncias é a identificação dos intermediários, com o objetivo de verificar se os subprodutos formados durante a oxidação são substâncias prejudiciais aos seres humanos e animais.

Na ozonização, dois oxidantes podem estar atuando: o ozônio molecular e os radicais OH. Valores baixos de pH (pH < 4) favorecem a oxidação via ozônio molecular, que é um oxidante mais seletivo com grupamentos específicos. O aumento do pH na ozonização ou a adição de H₂O₂ favorece a decomposição do O₃ em radicais OH. Em pH maior que 10, o O₃ é instantaneamente decomposto em radicais OH. Já em pH 7, ambos oxidantes podem estar atuando.

4.1. Remoção dos Estrogênios 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol e da Mistura 17 β -Estradiol/17 α -Etinilestradiol

As remoções dos estrogênios 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol em solução aquosa foram avaliadas por dois processos oxidativos: ozonização e O₃/H₂O₂. A ozonização foi realizada em três valores de pH (3, 7 e 11), enquanto que o processo de O₃/H₂O₂ em pH 3 e 7, com o objetivo de verificar a atuação dos radicais OH e do ozônio molecular na degradação desses estrogênios. A concentração inicial dos estrogênios foi de 10 μ g l⁻¹ quando oxidados separadamente e de 20 μ g l⁻¹ quando tratados em mistura (10 μ g l⁻¹ de cada estrogênio).

Não foi avaliada a degradação dos estrogênios em pH 11 pelo processo de O₃/H₂O₂, uma vez que, nesse pH, o ozônio é instantaneamente decomposto em radicais OH, não sendo necessária a adição de peróxido de hidrogênio para acelerar a formação desse oxidante.

4.1.1. Remoção dos Estrogênios por Ozonização

Na Figura 4.1 são apresentadas as remoções de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol quando ozonizados separadamente, enquanto que na Figura 4.2, a remoção da mistura 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol por ozonização nos três valores de pH estudados.

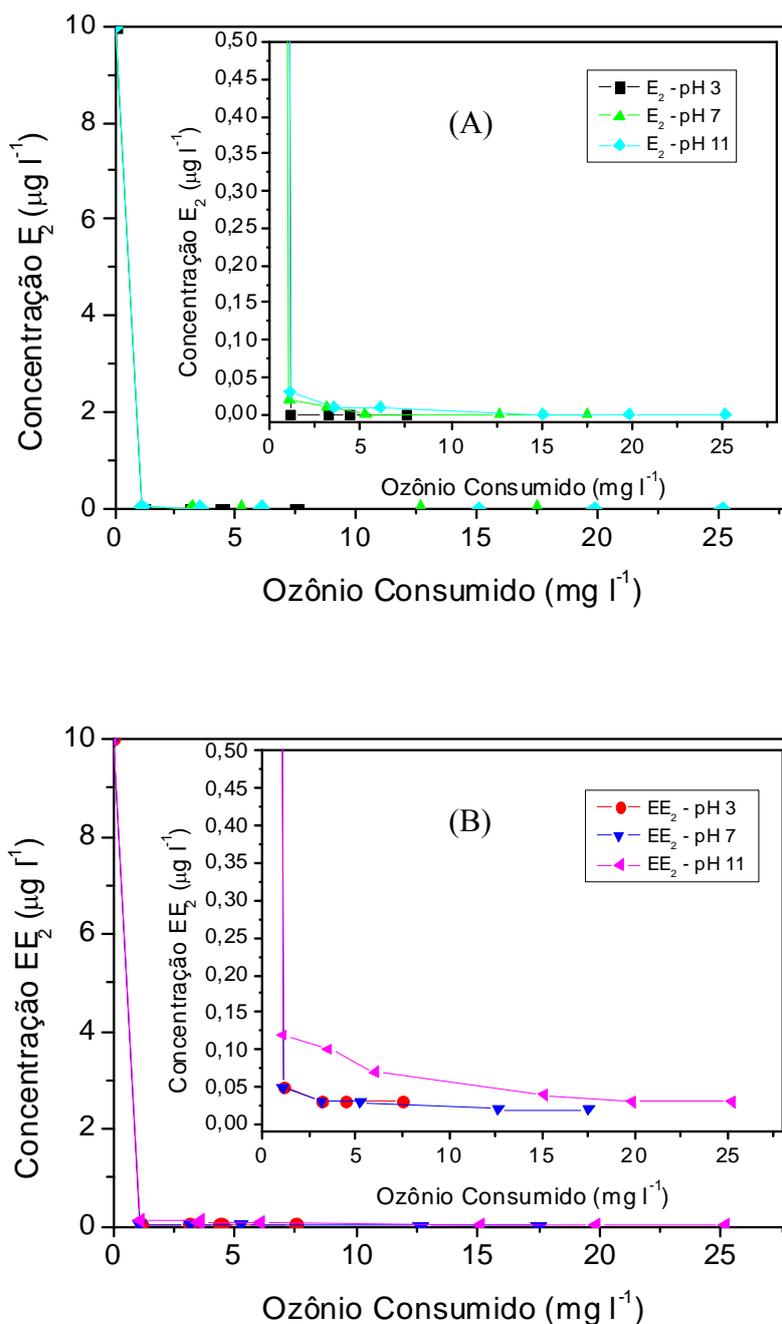
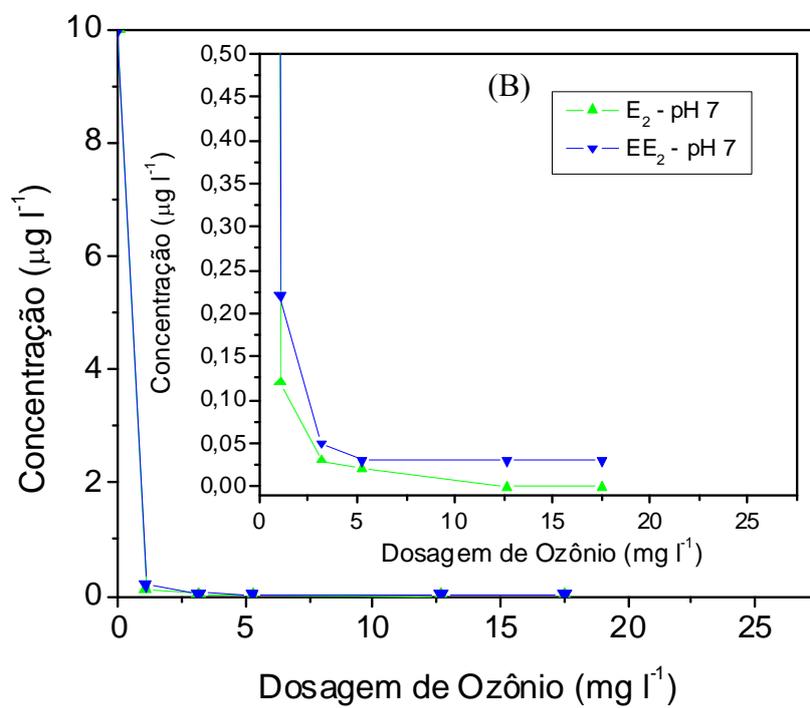
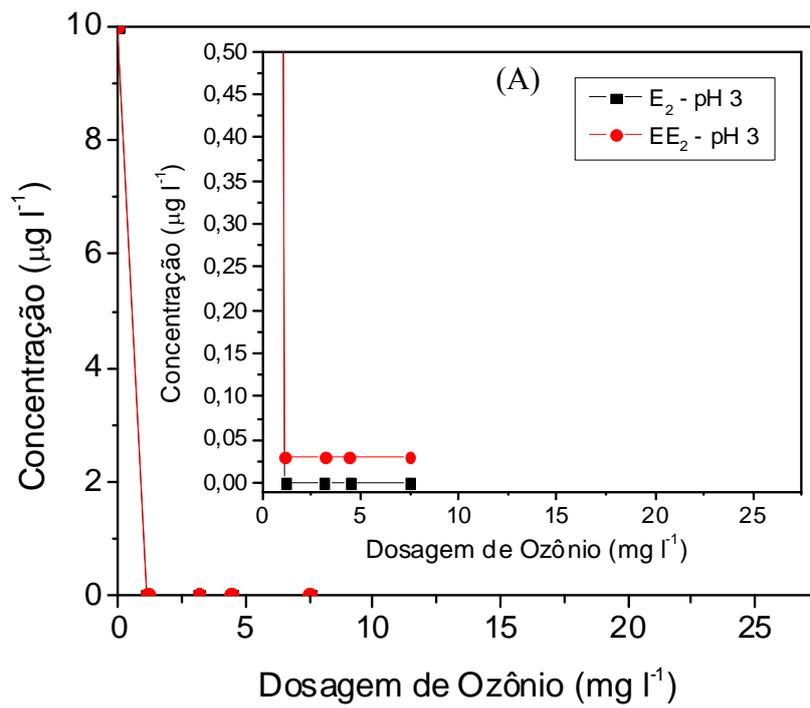


Figura 4.1. Remoção de (A) 17β -estradiol e de (B) 17α -etinilestradiol pelo processo de ozonização em pH 3, 7 e 11.



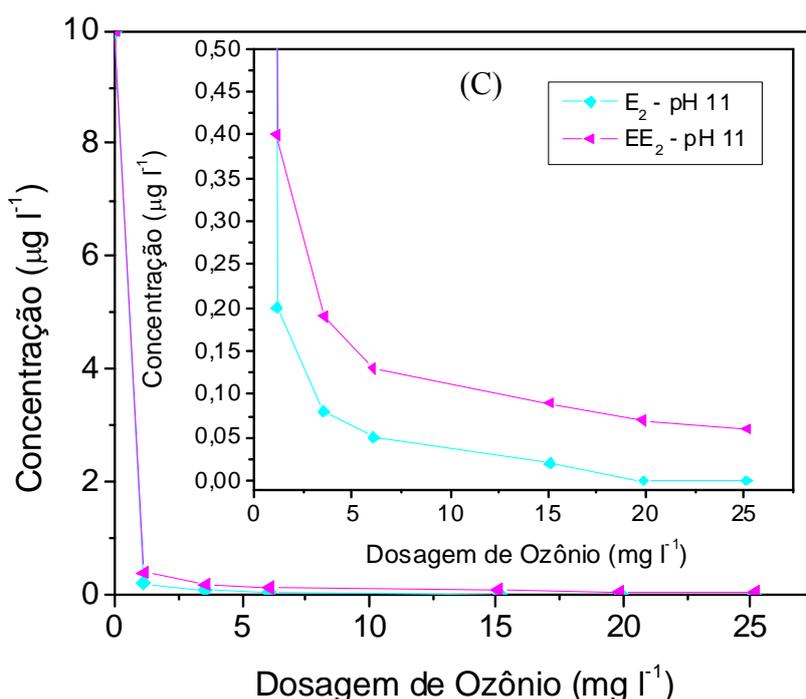


Figura 4.2. Remoção da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol pelo processo de ozonização em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

Pode-se verificar que a ozonização foi efetiva tanto na remoção dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol separadamente, quanto da mistura dessas substâncias. Tanto quando oxidados separadamente quanto em mistura, 17 β -estradiol foi ligeiramente mais facilmente removido que 17 α -etinilestradiol.

Quando os estrogênios foram ozonizados separadamente, as remoções alcançadas para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em pH 11 foram superiores a 99,7 e 98,8 %, enquanto que em pH 3, foram praticamente 100 % e de 99,5 %, o que corresponde a concentrações residuais de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol inferiores a 30 ng l⁻¹ e 120 ng l⁻¹, respectivamente, conforme pode ser observado na Figura 4.1.

Em mistura, no pH 11, a remoção de 17 β -estradiol foi superior a 98 %, enquanto que para 17 α -etinilestradiol foi superior a 96 %. Em pH 3, as remoções de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol foram de praticamente 100 % e de 99,7 %, respectivamente, conforme pode ser observado na Figura 4.2. Ou seja, para todas as dosagens de ozônio e valores de pH avaliados, as concentrações residuais de 17 β -estradiol e de 17 α -

etinilestradiol obtidas para a ozonização foram inferiores a 200 ng l⁻¹ e 400 ng l⁻¹, respectivamente.

A remoção dos estrogênios aumentou com o aumento da dosagem de ozônio, entretanto esse aumento foi pequeno quando os estrogênios se encontram em concentrações menores de 0,4 µg l⁻¹ para o pH 11, por exemplo. Isso evidencia a dificuldade de remoção em baixas concentrações residuais desses micropoluentes, uma vez que os estrogênios foram largamente removidos (acima de 96 %) mesmo com a menor dosagem de ozônio aplicada (1 mg l⁻¹).

Outros estudos apresentados na literatura mostraram a eficiente degradação de estrogênios (17β-estradiol, estrona e 17α-etinilestradiol) por ozonização e por processos oxidativos avançados (Bila *et al.*, 2007; Irmak *et al.*, 2005; Alum *et al.*, 2004; Ternes *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2003).

Bila *et al.* (2007) verificaram que a ozonização foi muito eficiente para a remoção de 17β-estradiol em solução aquosa, pois com baixas dosagens de ozônio (1,0 mg l⁻¹), foi alcançada remoção superior a 99 %. Irmak *et al.* (2005) verificaram que o tempo necessário para a completa degradação de 0,1 mmol de 17β-estradiol foi de 55 min, para dosagem de ozônio de 15 10⁻³ mmol min⁻¹. Alum *et al.* (2004) obtiveram mais de 99 % de remoção de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol utilizando a ozonização. Ternes *et al.* (2003) verificaram que o estrogênio natural estrona foi degradado a um valor abaixo do limite de quantificação, com dosagem de ozônio de 15 mg l⁻¹. Segundo Huber *et al.* (2003), 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol apresentaram alta constante de reação com ozônio, concluindo que a ozonização e processos oxidativos avançados são tecnologias promissoras na remoção de estrogênios presentes em água.

Sabe-se, da literatura, que nos diversos valores de pH diferentes formas do grupamento fenólico dos estrogênios podem ser encontradas. No caso do fenol, em pH muito ácido (pH < 4) a concentração de fenolato (B⁻) é desprezível, com isso, a espécie atacada pelos oxidantes seriam os fenóis. Em pH básico (pH > 10), praticamente todo fenol estaria na forma de fenolato, que é a espécie mais reativa (Huber *et al.*, 2003). Segundo Hoigné e Bader (1983) a constante de taxa de reação do ozônio com o fenolato (1,4 ± 0,4x10⁹ M⁻¹s⁻¹) é muito maior do que a constante de taxa de reação do ozônio com o fenol (1,3 ± 0,2x10³ M⁻¹s⁻¹). Portanto, é de se esperar que as reações de oxidação

de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol em pH básico sejam mais rápidas do que em pH ácido. Entretanto, os resultados mostraram que, principalmente para as maiores dosagens de ozônio, as remoções dos estrogênios nos diversos valores de pH avaliados foram muito semelhantes, não sendo verificada uma diferença significativa na concentração residual.

Na degradação dos estrogênios pelo processo de ozonização foi verificado que o consumo de ozônio em função do tempo de ozonização não foi o mesmo nos três valores de pH investigados, conforme pode ser verificado na Figura 4.3. Os maiores consumos de ozônio em pH 7 e 11 devem-se ao fato que nesses valores de pH o ozônio é continuamente decomposto em radicais OH, fato que não ocorre em pH 3.

Entretanto, independentemente da concentração inicial de estrogênio, ou seja, 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ quando ozonizados separadamente ou 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ quando tratados em conjunto, o consumo de ozônio foi o mesmo, conforme pode ser verificado na Figura 4.4. A semelhança no consumo de ozônio para os dois valores de concentração inicial de estrogênios provavelmente deve-se à baixíssima quantidade de micropoluentes presente na solução aquosa.

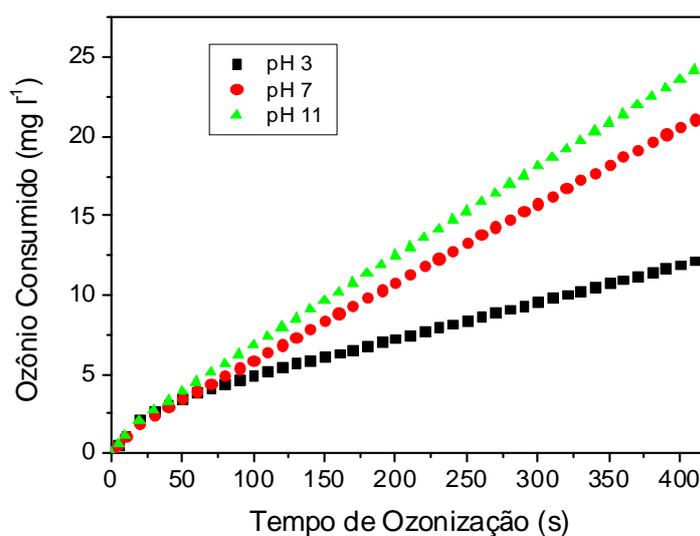


Figura 4.3. Consumo de ozônio durante a ozonização dos estrogênios nos três valores de pH investigados.

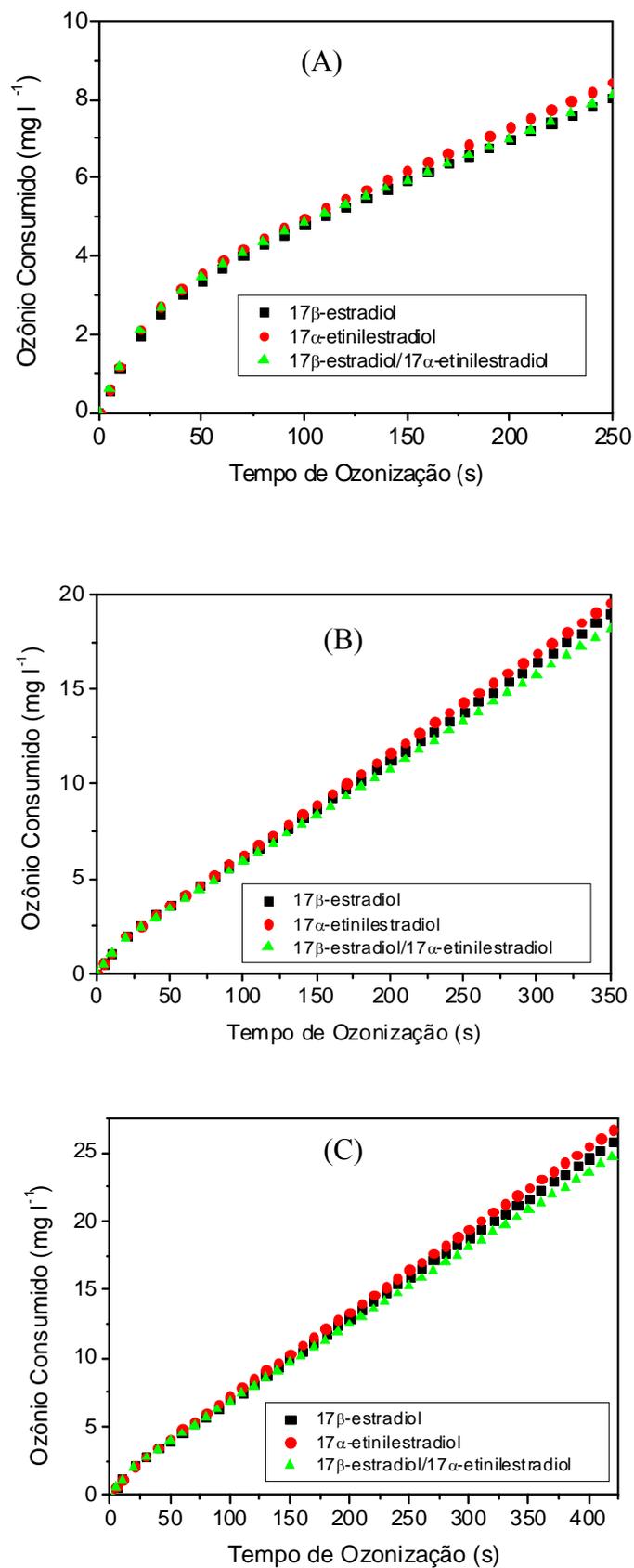


Figura 4.4. Comparação do consumo de ozônio durante a ozonização dos estrogênios em mistura e separados, nos valores de (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

O tempo de ozonização utilizado nos experimentos variou de 10 a 240 s em pH 3, de 10 a 330 s em pH 7 e de 10 a 420 s em pH 11, o que corresponde a uma concentração de ozônio consumido variando de 1,0 a 7,5 mg l⁻¹, 1,0 a 17,5 mg l⁻¹ e 1,0 a 25,0 mg l⁻¹ em pH 3, 7 e 11, respectivamente.

4.1.2. Remoção dos Estrogênios pelo Processo de O₃/H₂O₂

O processo de O₃/H₂O₂ foi efetivo na remoção dos estrogênios 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol e da mistura de estrogênios em solução aquosa, conforme pode ser observado nas Figuras 4.5 e 4.6.

Quando oxidados separadamente em pH 7, as remoções dos estrogênios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol foram superiores a 99,7 e 98,9 %, enquanto que em pH 3 foram praticamente de 100,0 e de 99,7%, conforme mostra a Figura 4.5. Quando em mistura em pH 7, as remoções dos estrogênios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol foram superiores a 99,0 e 98,0 %, enquanto que em pH 3 foram praticamente de 100,0 e de 99,2 %, respectivamente, conforme pode ser observado na Figura 4.6.

Praticamente não foi verificada diferença na remoção dos estrogênios pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂ na razão molar de O₃/H₂O₂ de 2:1 e nos valores de pH investigados. Ou seja, não houve incremento na remoção dos estrogênios com a adição de H₂O₂ ao ozônio. O processo de O₃/H₂O₂ comparado à ozonização, não resultou no aumento da remoção dos estrogênios separados e da mistura de estrogênios.

A dosagem de peróxido de hidrogênio que foi utilizada é considerada uma dosagem ótima, pois concentrações dessa substância superiores às consideradas ideais ao processo implicam num acúmulo do oxidante no meio reacional, que passa a atuar como capturador dos radicais hidroxila, resultando numa redução da eficiência de degradação (Paillard *et al.*, 1988; Balcioglu e Ötker, 2003). Na equação 4.1 é mostrada a reação entre o radical OH e peróxido de hidrogênio formando o radical hidroperoxila, que possui menor poder de oxidação que o radical OH (Legrini *et al.*, 1993).



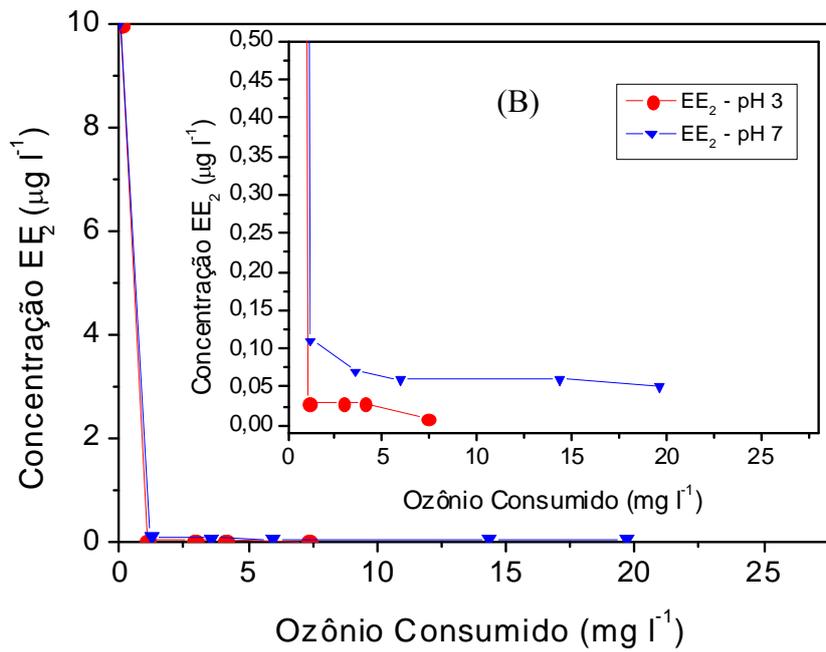
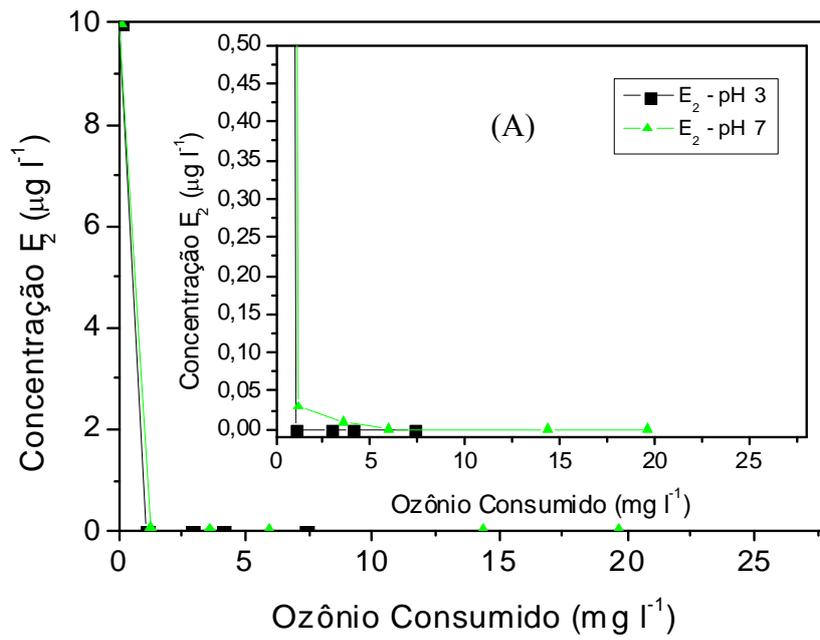


Figura 4.5. Remoção dos estrogênios (A) 17β-estradiol e (B) 17α-etinilestradiol pelo processo de O₃/H₂O₂ (razão molar O₃/H₂O₂ de 2:1), nos valores de pH 3 e 7.

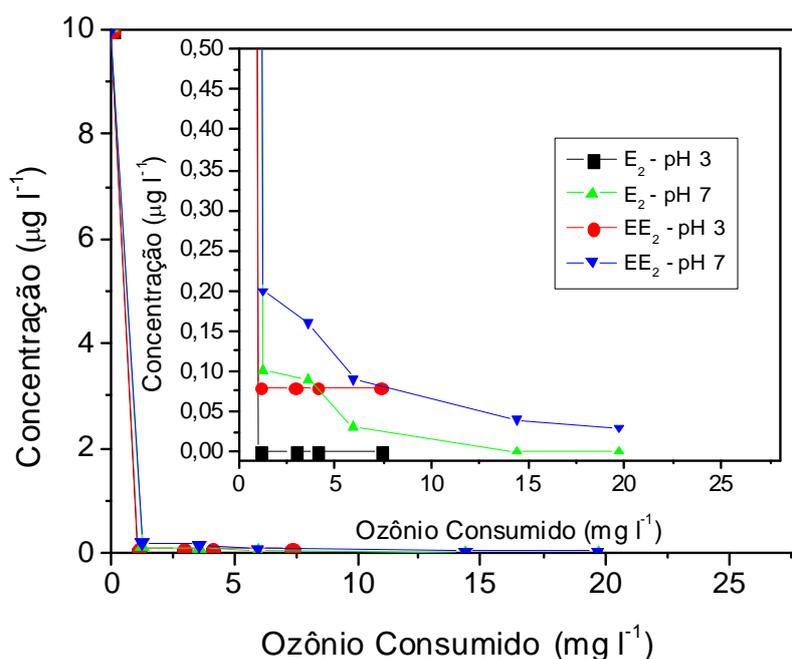


Figura 4.6. Remoção da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol pelo processo de O₃/H₂O₂ (razão molar O₃/H₂O₂ de 2:1) nos valores de pH 3 e 7.

Para o processo O₃/H₂O₂, conforme também obtido para a ozonização, o consumo de ozônio em função do tempo não foi o mesmo para os dois valores de pH avaliados (pH 3 e 7). O consumo de ozônio em função do tempo pode ser observado na Figura 4.7.

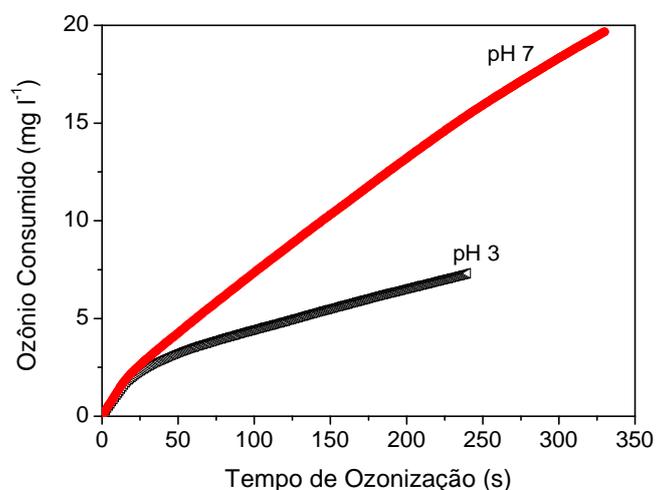


Figura 4.7. Consumo de ozônio durante a oxidação dos estrogênios pelo processo O₃/H₂O₂, nos valores de pH 3 e 7.

O tempo de ozonização utilizado nos experimentos variou de 10 a 240 s em pH 3 e de 10 a 330 s em pH 7, correspondendo a uma concentração de ozônio consumido variando de 1,0 a 7,5 mg l⁻¹ e de 1,0 a 20,0 mg l⁻¹ em pH 3 e 7, respectivamente.

Observou-se que, em pH 3 para o processo O₃/H₂O₂, o consumo de ozônio não foi maior que o observado para a ozonização realizada nesse mesmo pH. Isso indica que a oxidação em pH 3 pelo processo O₃/H₂O₂ deve ter ocorrido predominantemente via ozônio molecular.

A decomposição do ozônio em radicais OH pode ser acelerada pela adição de H₂O₂. Entretanto, para que ocorra a reação do ozônio com o peróxido de hidrogênio com conseqüente formação de radicais hidroxila, o peróxido de hidrogênio deve estar na forma dissociada. O aumento do pH favorece a dissociação do peróxido de hidrogênio. Logo, em pH 3, a dissociação do peróxido é muito pequena e há formação de pequena quantidade de radicais OH. Isto indica que, em pH 3, a oxidação pelo processo O₃/H₂O₂ ocorre predominantemente via ozônio molecular (Staehelin and Hoigné, 1982).

4.1.3. Remoção da Mistura de Estrogênios pelos Processos de Ozonização e O₃/H₂O₂ na Presença de Terc-Butanol

A oxidação da mistura 17β-estradiol/17α-etinilestradiol foi realizada na presença e na ausência de terc-butanol, um capturador de radicais OH, que reage com o radical OH, mas não com o ozônio molecular. O objetivo foi verificar a atuação dos radicais OH nos diferentes valores de pH avaliados, tanto para a ozonização quanto para o processo de O₃/H₂O₂.

Terc-butanol (C₄H₉OH) apresenta alta constante de reação com radical hidroxila (K = 5 10⁸ M⁻¹ s⁻¹) (AWWA Research Foundation, 1991, apud Ma e Graham, 2000). A reação entre o radical OH e terc-butanol resulta no término da reação radicalar e é mostrada pela Equação 4.2.

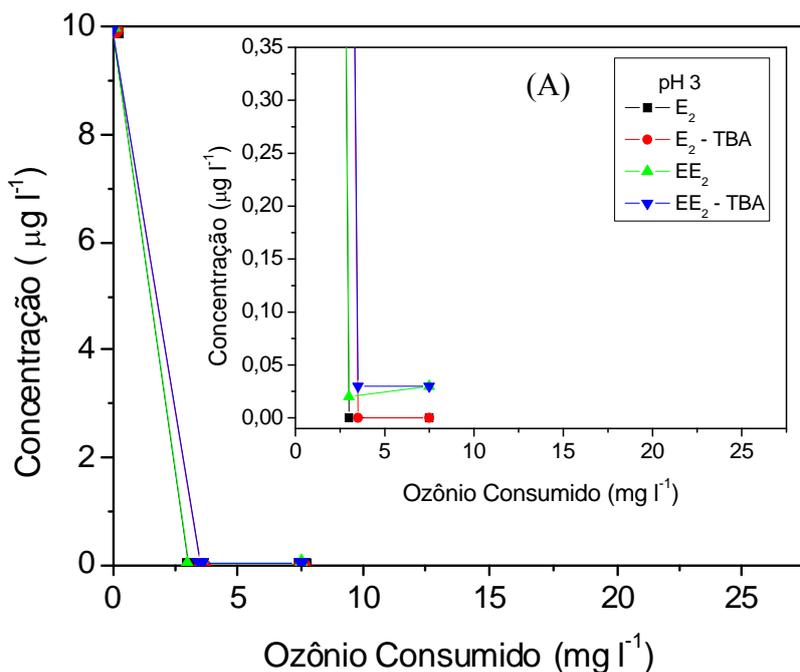


Foi utilizada uma concentração de terc-butanol de 4 10⁻³ mol l⁻¹, pois segundo López *et al.* (2004) e López-López *et al.* (2007), uma concentração de terc-butanol igual

a $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ é suficiente para capturar os radicais OH. López *et al.* (2004) e López-López *et al.* (2007) avaliaram a ozonização de corantes (concentração inicial na faixa de $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) em pH variando de 5 a 9, na presença e ausência de terc-butanol.

Na Figura 4.8 é mostrada a remoção dos estrogênios em mistura na presença e ausência de terc-butanol, nos três valores de pH avaliados.

Pode-se observar, a partir da Figura 4.8 que, com a utilização do terc-butanol, não houve alteração na remoção da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol pelo processo de ozonização em pH 3. Entretanto, em pH 7 e 11, houve uma menor remoção dos estrogênios com a utilização do capturador de radicais OH, provavelmente, devido a menor quantidade de radicais OH, que nesse pH é um dos oxidantes.



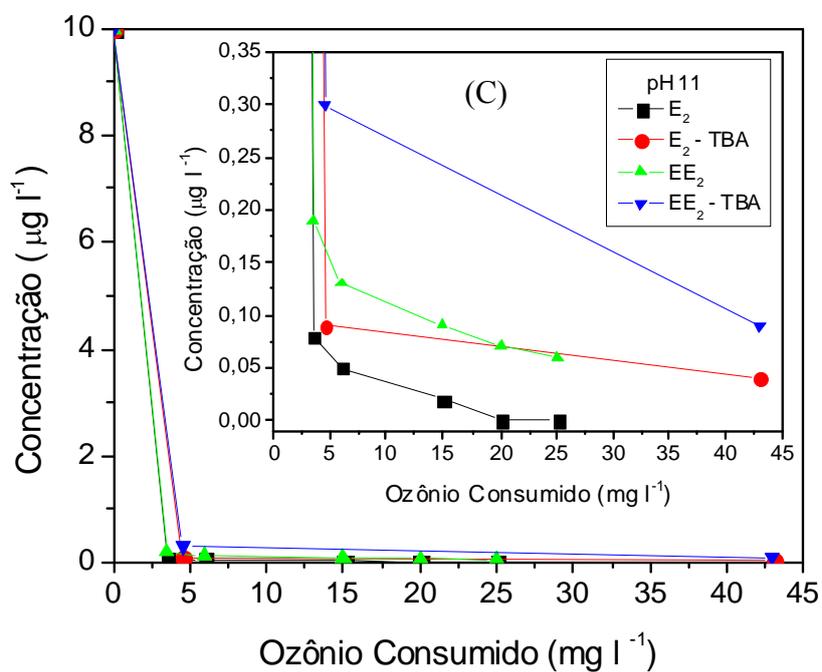
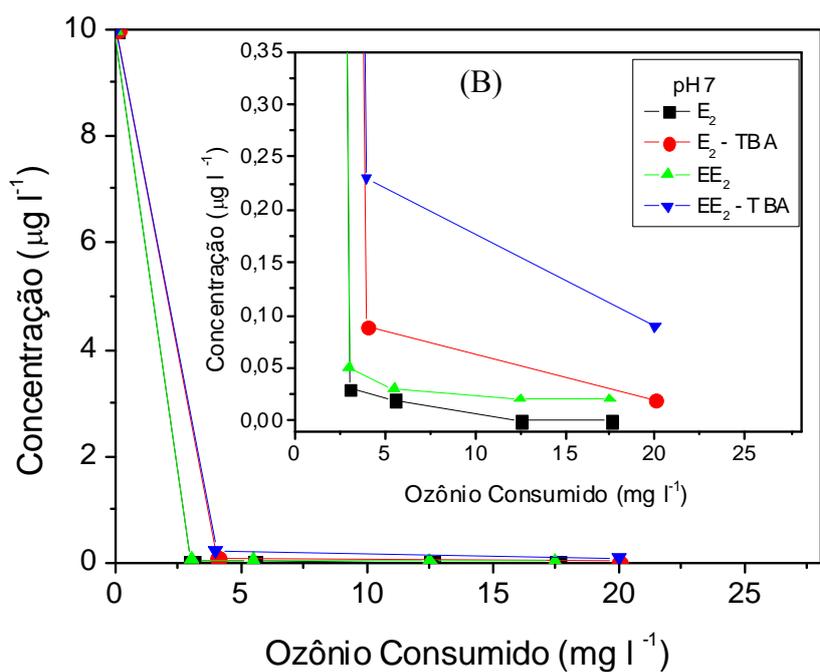


Figura 4.8. Remoção da mistura 17β-estradiol/17α-etinilestradiol por ozonização na presença e ausência de terc-butanol (TBA), em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

Para a mistura de estrogênios, com uma dose de ozônio de 3,5 mg l⁻¹ em pH 3 foi possível remover praticamente 100 % de 17β-estradiol e 99,7 % de 17α-etinilestradiol, na presença ou ausência de terc-butanol, resultando em uma concentração residual abaixo do nível de detecção (< 5 ng l⁻¹) e de 30 ng l⁻¹, respectivamente, conforme pode ser observado na Figura 4.8 (A).

Na Tabela 4.1 tem-se os resultados obtidos para as remoções dos estrogênios em mistura ozonizados em pH 7 e 11 na presença e ausência de terc-butanol. Esses valores foram apresentados nas Figuras 4.8 (B) e (C).

Tabela 4.1. Remoções dos estrogênios em mistura ozonizados em pH 7 e 11 na presença e ausência de terc-butanol.

pH e Ozônio Consumido	terc-Butanol	Resultado	17β-estradiol	17α-etinilestradiol
pH 7 4,0 mg l ⁻¹	Ausência	Remoção	99,75 %	99,6 %
		Concentração Residual	25 ng l ⁻¹	40 ng l ⁻¹
	Presença	Remoção	99,1 %	97,7 %
		Concentração Residual	90 ng l ⁻¹	230 ng l ⁻¹
pH 11 4,5 mg l ⁻¹	Ausência	Remoção	99,3 %	98,4 %
		Concentração Residual	68 ng l ⁻¹	166 ng l ⁻¹
	Presença	Remoção	99,1 %	97,0 %
		Concentração Residual	90 ng l ⁻¹	300 ng l ⁻¹

Esse mesmo comportamento foi obtido com a utilização do terc-butanol durante a oxidação dos estrogênios pelo processo de O_3/H_2O_2 , ou seja, igual remoção da mistura de estrogênios em pH 3 com e sem terc-butanol e menor remoção em pH 7 com a utilização do capturador de radicais OH.

A presença do capturador de radicais OH durante o processo de ozonização resultou em um aumento no consumo de ozônio, para os valores de pH 7 e 11, conforme pode ser observado na Figura 4.9. Esse aumento pode ser explicado devido ao consumo de uma parte do ozônio durante a produção de radicais OH, que são removidos pelos capturadores de radicais OH. A sequência de produção de radicais OH e remoção desses radicais pelo capturador pode ser responsável pelo consumo de ozônio.

Em pH 3 não houve alteração no consumo de ozônio devido a presença do capturador de radicais OH pois, em pH 3, praticamente não há formação de radicais OH, nem mesmo para o processo de O_3/H_2O_2 , conforme explicado anteriormente. Conforme também ocorreu para os ensaios sem terc-butanol, o ozônio consumido variou apenas com relação ao pH da ozonização, ou seja, a concentração inicial de estrogênio não provocou efeito na concentração de ozônio consumido.

As concentrações de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol encontradas nas águas de abastecimento são menores que a estudada nesse trabalho, conforme revisão realizada por Bila e Dezotti (2003). Entretanto, a água de abastecimento possui outros micropoluentes orgânicos que irão consumir parte do ozônio introduzido na água durante o processo de tratamento. Portanto, provavelmente as dosagens de ozônio aplicadas atualmente nas plantas de tratamento de água de abastecimento ($1,0 \text{ mg l}^{-1}$) não são suficientes para remover completamente esses estrogênios, devido, principalmente, a dificuldade de remoção de baixas concentrações residuais.

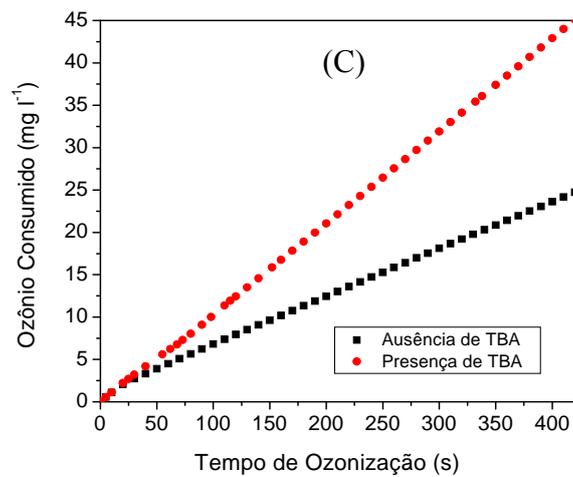
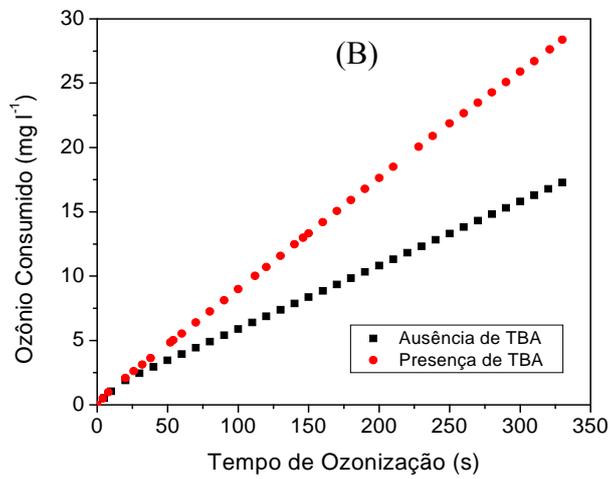
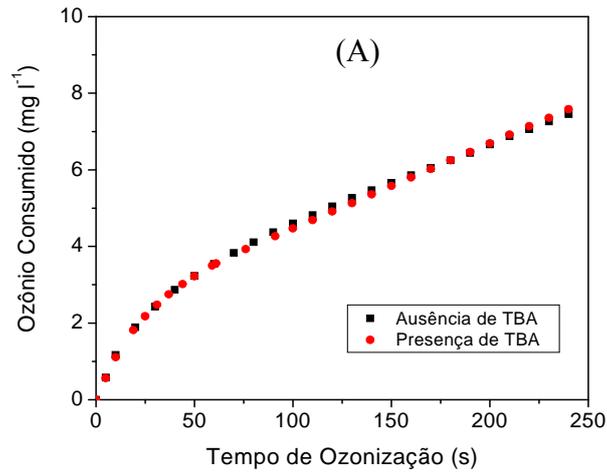


Figura 4.9. Consumo de ozônio em função do tempo de ozonização para a ozonização da mistura de estrogênios (concentração inicial de $10\mu\text{g l}^{-1}$ de cada estrogênio) na presença e ausência de terc-butanol (TBA) em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

É importante verificar a eficiência dos processos de ozonização e O_3/H_2O_2 na remoção da atividade estrogênica, uma vez que, embora as remoções dos estrogênios tenham sido altas, a concentração residual em nível de $ng\ l^{-1}$ ainda é suficiente para provocar efeitos em animais (Routledge *et al.* (1998)).

Foram realizados ensaios de atividade estrogênica com o objetivo de verificar se os processos avaliados foram capazes de remover a atividade estrogênica dos estrogênios e dos intermediários formados durante a oxidação. Para isso, foi utilizado o ensaio de atividade estrogênica *in vitro* YES (“Yeast Estrogen Screen”), devido à rapidez, à reprodutibilidade e à sensibilidade (Beresford *et al.* (2000) e Payne *et al.* (2000)).

4.2. Atividade Estrogênica

No ensaio YES, a atividade estrogênica das substâncias ou amostras pode ser medida por meio da mudança de coloração do substrato cromogênico CPRG presente no meio de análise. Quando uma substância estrogênica está presente, a coloração do CPRG muda de amarelo para vermelho. 17β -estradiol é considerado o padrão dos ensaios de atividade estrogênica, razão pela qual é feita a comparação da atividade estrogênica da amostra testada com a atividade de 17β -estradiol.

A atividade estrogênica de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol está relacionada à sua estrutura química. A posição do grupo fenólico é responsável pela alta afinidade em ligar o estrogênio ao receptor de estrogênio e elucidar a resposta estrogênica (Birkett e Lester, 2002). Portanto, um processo de tratamento que leve ao rompimento do anel fenólico da molécula pode resultar na remoção da atividade estrogênica.

Sabe-se, da literatura, que a ozonização de micropoluentes orgânicos é um processo eficiente para compostos que contém grupo amina, anel aromático ou dupla ligação (von Gunten, 2003). O ozônio reage rapidamente com compostos fenólicos em soluções aquosas (Huang e Shu, 1995). Isso indica que a ozonização tende a ser eficiente na remoção da atividade estrogênica de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol. Na Figura 4.10 têm-se as estruturas desses dois estrogênios.

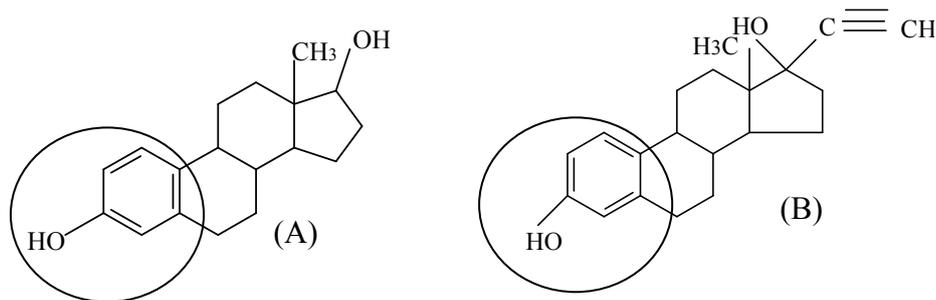


Figura 4.10. Estrutura dos hormônios (A) 17β -estradiol e (B) 17α -etinilestradiol.

Para cada ensaio realizado uma curva dose-resposta de 17β -estradiol foi produzida na faixa de concentração de $2,72 \mu\text{g l}^{-1}$ a $1,33 \text{ ng l}^{-1}$. Essa faixa de concentração refere-se à concentração dentro de cada poço da placa. A curva dose-resposta de 17β -estradiol foi ajustada por regressão não linear sigmoideal (Routledge e Sumpter, 1996). A máxima indução da atividade estrogênica foi de $2,87 \pm 0,02$ e o CE_{50} (concentração que elucida 50 % da atividade) foi de $4,53 \cdot 10^{-8} \pm 2,15 \cdot 10^{-9} \text{ g l}^{-1}$.

Os resultados de atividade estrogênica dos extratos das amostras oxidadas foram comparados com a curva padrão de 17β -estradiol. A atividade estrogênica foi representada por meio de curvas dose-respostas dos valores de absorbância corrigidos em função da concentração para 17β -estradiol (padrão utilizado para comparação) e em função do fator de diluição para os extratos das amostras ozonizadas serialmente diluídas. Portanto, as abcissas das curvas dose-respostas do padrão 17β -estradiol e dos extratos das amostras oxidadas são diferentes. A primeira apresenta como abcissa a concentração do estrogênio e a segunda, o fator de diluição das amostras diluídas em série.

4.2.1. Comparação dos Potenciais Estrogênicos

A fim de comparar os potenciais estrogênicos de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol pelo teste YES, foram obtidas curvas dose-respostas desses estrogênios em etanol, na faixa de concentração de $2,72 \mu\text{g l}^{-1}$ a $1,33 \text{ ng l}^{-1}$, mostradas na Figura 4.11. Essas curvas foram construídas com valores de absorbância corrigidos, obtidos pela Equação 3.1, em função da concentração dos estrogênios.

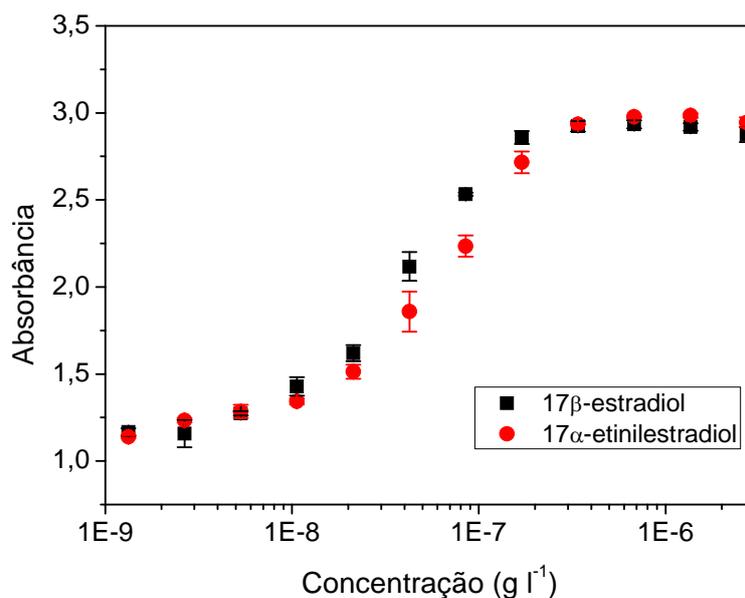


Figura 4.11. Curvas dose-respostas dos estrogênios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, obtidas pelo ensaio YES.

Pode-se verificar na Figura 4.11 que 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol apresentaram potenciais estrogênicos bastantes próximos pelo teste YES. O potencial estrogênico de 17β-estradiol foi apenas levemente superior ao potencial de 17α-etinilestradiol. Outros trabalhos encontrados na literatura mostraram a semelhança do potencial estrogênico dessas substâncias (Beck *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2004; Van den Belt *et al.*, 2004; Folmar *et al.*, 2002). Nesses trabalhos, a diferença entre o potencial estrogênico dessas substâncias foi inferior a 30 %.

Três tipos de efeitos podem ser verificados na atividade estrogênica com a combinação de estrogênios: sinergismo, antagonismo e aditivo. Sinergismo e antagonismo podem ser definidos como desvios dos efeitos esperados, onde sinergismo representa efeito maior que o esperado e antagonismo representa efeito menor. Quando os efeitos esperados são obtidos, o resultado da combinação pode ser definido como efeito aditivo. O teste de atividade estrogênica YES é bastante indicado para análise da combinação de compostos estrogênicos (Payne *et al.*, 2000).

Uma vez que os potenciais estrogênicos de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol obtidos nesse trabalho são semelhantes, foram produzidas curvas dose-respostas de 17β -estradiol e da mistura 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol em etanol, pelo teste YES, com o objetivo de verificar se a combinação desses estrogênios resultaria em efeito aditivo, sinérgico ou antagônico na atividade estrogênica. Para isso, a mistura dos estrogênios foi preparada com concentração em massa de 50 % de cada estrogênio. Na Figura 4.12 são apresentadas as curvas dose-respostas do estrogênio 17β -estradiol e da mistura 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol.

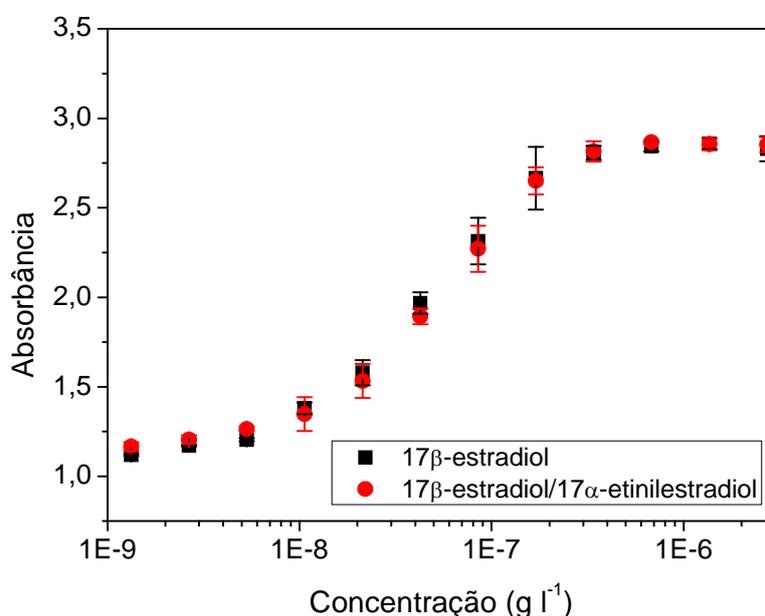


Figura 4.12. Curvas dose-respostas de 17β -estradiol (concentração no poço de $2,72 \mu\text{g l}^{-1}$ a $1,33 \text{ ng l}^{-1}$) e da combinação 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol (concentração no poço de $1,36 \mu\text{g l}^{-1}$ a $0,66 \text{ ng l}^{-1}$ de cada estrogênio) obtidas pelo ensaio YES.

Pode-se verificar a partir da Figura 4.12, que a mistura 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol e 17β -estradiol apresentaram potenciais estrogênicos similares, levando a conclusão que a combinação dos estrogênios apresentou efeito aditivo na atividade estrogênica, uma vez que a atividade da associação desses estrogênios não foi superior ao maior potencial, nem inferior ao menor potencial apresentado pelas substâncias individualmente.

A concentração que elucida 50 % da atividade estrogênica (CE_{50}) foi obtida por meio das curvas dose-respostas por meio de regressão não linear sigmoidal (Equação 3.2). Os valores obtidos para CE_{50} e PR (potência estrogênica relativa a 17β -estradiol) dos estrogênios e da mistura 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Valores obtidos para CE_{50} e PR por regressão não linear.

Estrogênio	CE_{50} ($g\ I^{-1}$)	PR
17 β -estradiol	$4,53.10^{-8} \pm 2,15.10^{-9}$	1
17 α -etinilestradiol	$6,34.10^{-8} \pm 4,11.10^{-9}$	0,71
17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol	$5,42.10^{-8} \pm 2,16.10^{-9}$	0,84

A partir da Tabela 4.2 verifica-se que os valores de CE_{50} obtidos para os estrogênios 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e para a mistura de estrogênios foram bastante próximos. 17α -etinilestradiol apresentou potencial estrogênico inferior em 30% em relação a 17β -estradiol, enquanto que a mistura apresentou potencial intermediário entre os valores obtidos para os estrogênios separadamente, mostrando que a combinação dos estrogênios resultou em efeito aditivo na atividade estrogênica, quando utilizado o ensaio YES. Esse mesmo resultado foi obtido por Chen *et al.* (2007) na avaliação do efeito resultante da combinação dos estrogênios 17α -estradiol e 17α -etinilestradiol.

4.2.2. Redução da Atividade Estrogênica pelo Processo de Ozonização

Os resultados da atividade estrogênica dos extratos das amostras de 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e da mistura 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol ozonizadas nos três valores de pH podem ser observados nas Figuras 4.13 a 4.15.

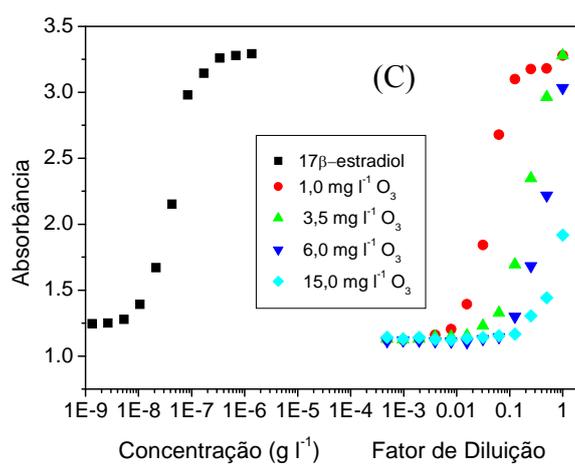
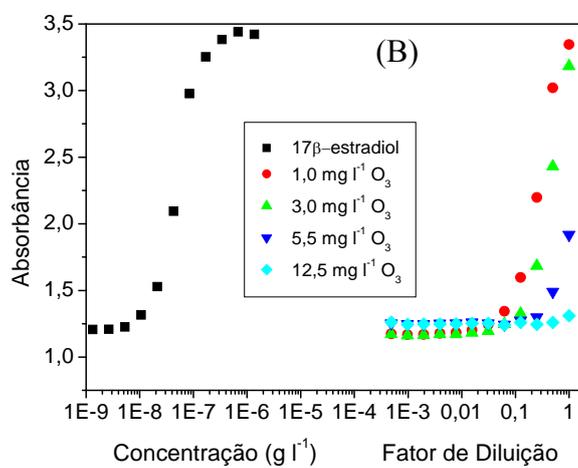
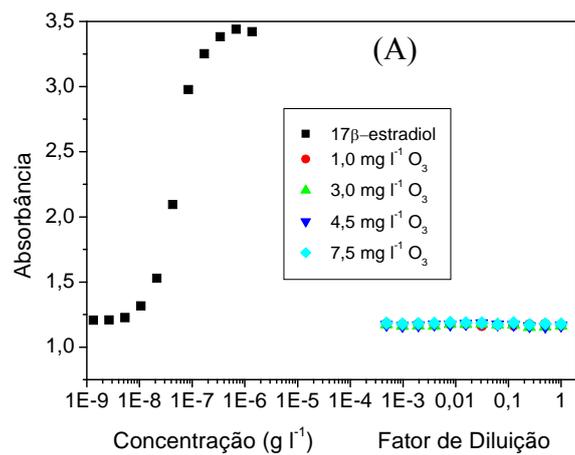


Figura 4.13. Comparação das curvas dose-respostas de 17β-estradiol e dos extratos das amostras de 17β-estradiol (concentração inicial de 10 μg l⁻¹) ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

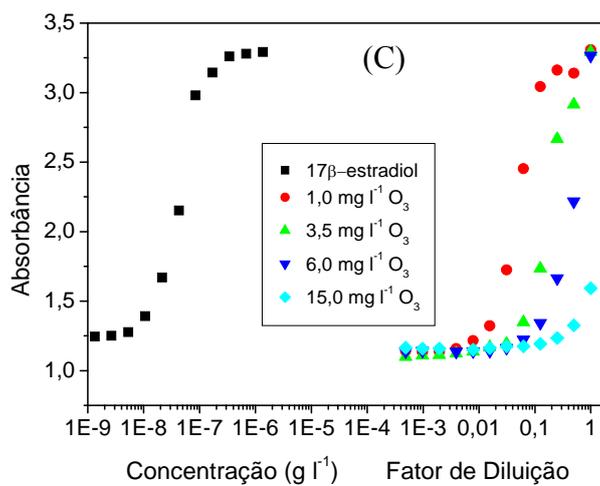
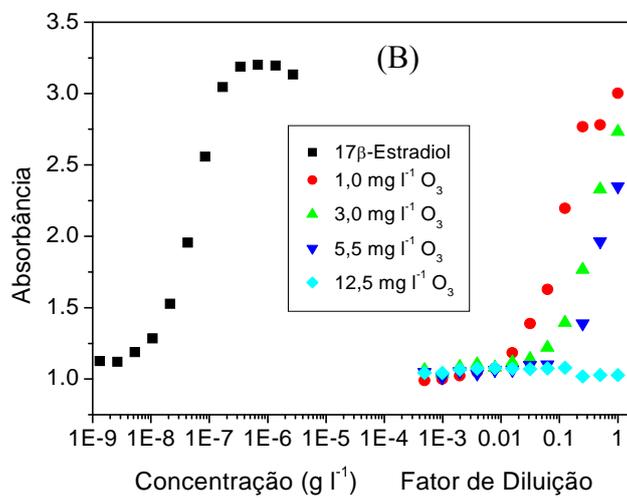
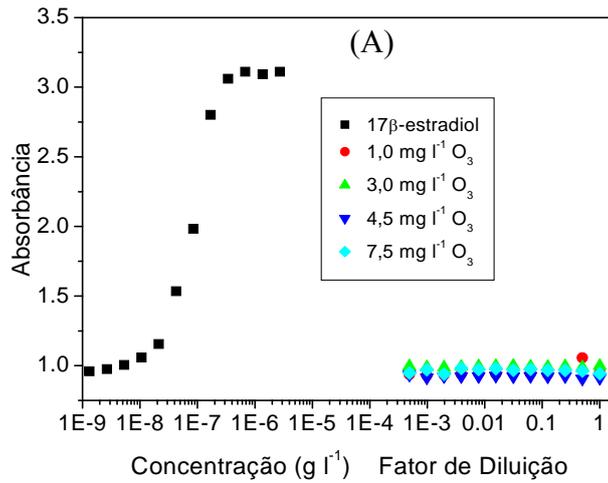


Figura 4.14. Comparação das curvas dose-respostas de 17β-estradiol e dos extratos das amostras de 17α-etinilestradiol (concentração inicial de 10 μg l⁻¹) ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

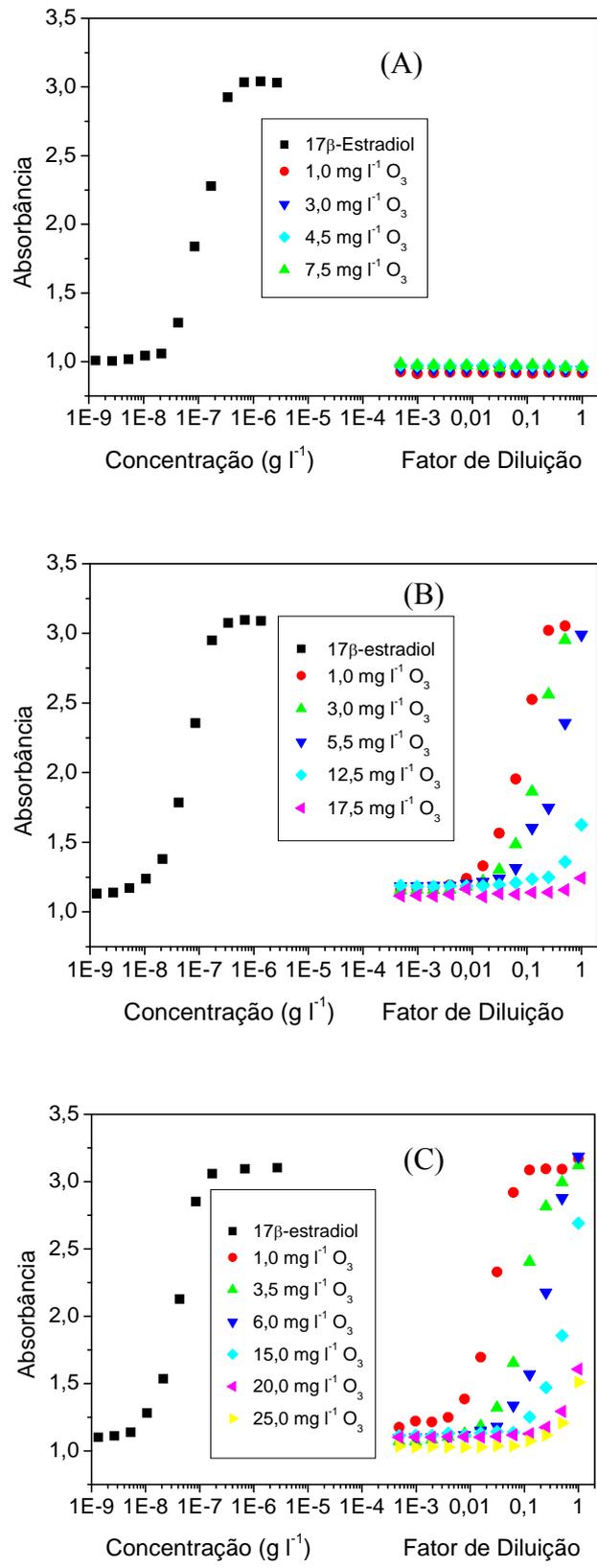


Figura 4.15. Comparação das curvas dose-respostas de 17β-estradiol e dos extratos das amostras da mistura 17β-estradiol/17α-etinilestradiol (concentração inicial de 10 μg l⁻¹ de cada) ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

Nas Figuras 4.13 a 4.15 pode-se verificar uma diferença na remoção da atividade estrogênica nos diversos valores de pH avaliados, tanto para os estrogênios ozonizados separadamente, quanto em mistura.

Em pH 7 e 11 houve uma considerável redução da atividade estrogênica com o aumento da dosagem de ozônio, entretanto, a atividade estrogênica não foi completamente removida, mesmo com altas doses de ozônio. Pode-se observar que os extratos das amostras oxidadas em pH 7 e 11 quase atingiram o máximo de absorbância alcançada pelo 17 β -estradiol (padrão), mostrando que são fortemente estrogênicas. As amostras ozonizadas em pH 11 apresentaram maior atividade estrogênica que as amostras em pH 7. Em pH 3, a atividade estrogênica foi totalmente removida, mesmo para baixas concentrações de ozônio consumido (1 mg l⁻¹).

As dosagens de ozônio comumente utilizadas nas plantas de tratamento de água são na faixa de 1,0 mg l⁻¹ de ozônio (Harrison, 2000). Verificou-se que essa dosagem não foi suficiente para remover a atividade estrogênica dos extratos de 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e da mistura desses estrogênios em pH 7 e 11.

Como houve uma alta remoção dos estrogênios nos valores de pH investigados (conforme observado nas Figuras 4.1 e 4.2) e a atividade estrogênica ainda permaneceu em pH 7 e 11, pode-se concluir que provavelmente nesses valores de pH houve a formação de intermediários que apresentaram estrogenicidade similar a de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol, uma vez que essas substâncias foram rapidamente removidas no início da ozonização (> 96 %) e a atividade estrogênica residual foi muito alta.

A formação de intermediários com atividade estrogênica em pH 7 e 11 pode estar relacionada aos agentes oxidantes que atuam nos diversos valores de pH. Em pH 3, há atuação somente do ozônio molecular, oxidante altamente seletivo capaz de destruir o grupamento fenólico (grupamento responsável pela atividade estrogênica de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol). Por outro lado, em pH 11 há atuação somente dos radicais OH, que são oxidantes não seletivos. Em pH 7, ambos oxidantes podem estar atuando. Portanto, sugere-se que a oxidação via radical OH leve a formação de intermediários com atividade estrogênica.

Estudos da literatura (Rosenfeldt *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Alum *et al.*, 2004) mostraram a redução na atividade estrogênica de estrogênios como 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, utilizando alguns processos oxidativos. Ressalta-se que, assim como nesse trabalho, a atividade estrogênica não foi completamente removida, mesmo com altas doses de ozônio aplicada, devido aos subprodutos formados.

Rosenfeldt *et al.* (2007) verificaram que, utilizando o teste YES, 90 % da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol foi removida quando utilizaram o processo combinado H₂O₂/UV.

Huber *et al.* (2004) observaram que dosagens de ozônio tipicamente utilizadas em desinfecção de água potável foram suficientes para reduzir a estrogenicidade de 17 α -etinilestradiol em mais de 200 vezes em pH 8. Entretanto, foi impossível remover completamente a atividade estrogênica de 17 α -etinilestradiol.

Kim *et al.* (2004) verificaram que, com a ozonização de 17 β -estradiol, a estrogenicidade não foi removida significativamente com o aumento da dosagem de ozônio (em pH 6,0). Concluíram que houve a formação de intermediários que apresentaram estrogenicidade similar a de 17 β -estradiol, uma vez que essa substância foi rapidamente removida no início da ozonização.

Alum *et al.* (2004) verificaram que, apesar da remoção de 99 % dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, a atividade estrogênica não foi completamente removida em pH 7,5, devido aos subprodutos formados durante a ozonização.

Dessa forma, pode-se concluir que os resultados obtidos nesse trabalho concordam com outros que vem sendo publicados na literatura.

4.2.2.1. Avaliação da Concentração Equivalente de 17 β -Estradiol

A atividade estrogênica dos extratos das amostras oxidadas pode ser expressa como concentração equivalente de 17 β -estradiol (EQ-E₂). EQ-E₂ é definida como a concentração de 17 β -estradiol que elucida a mesma resposta da amostra oxidada, no

ensaio YES. O EQ-E₂ faz uma comparação do potencial estrogênico da amostra oxidada com o potencial estrogênico de 17β-estradiol. Na Figura 4.16 são mostrados os resultados de EQ-E₂ dos extratos das amostras de 17β-estradiol/17α-etinilestradiol ozonizadas nos três valores de pH investigados.

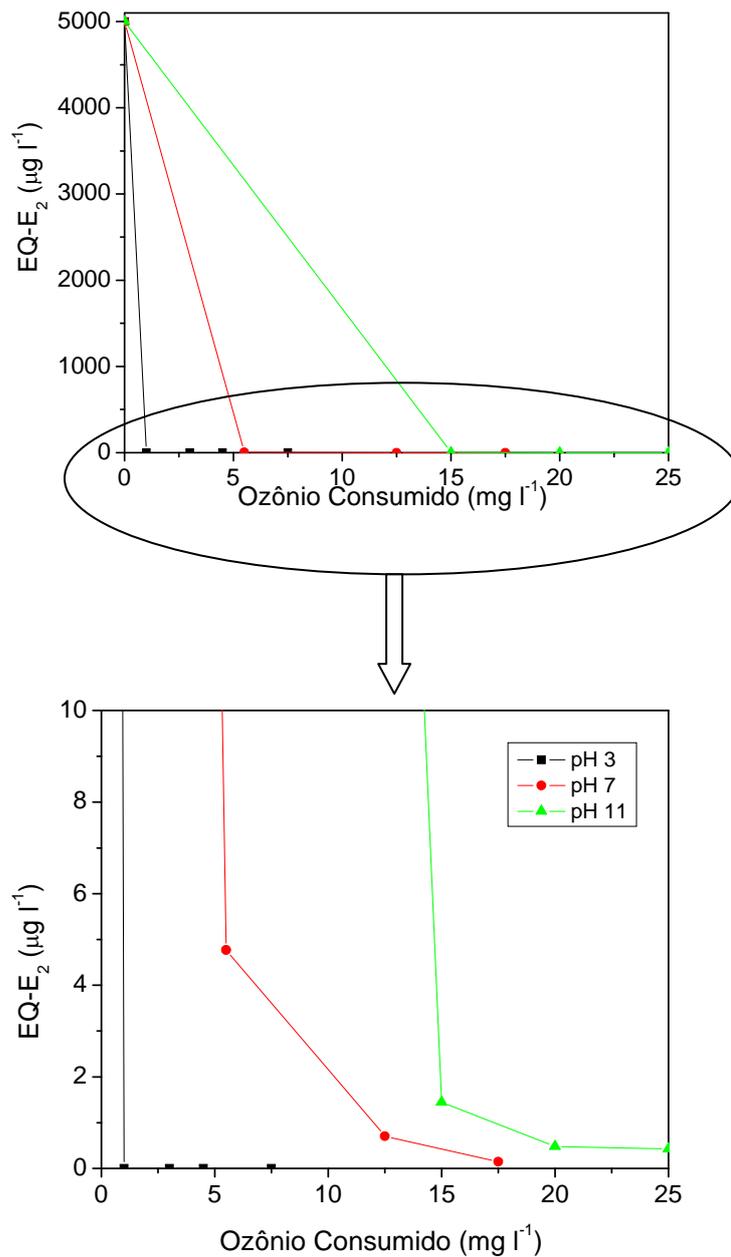


Figura 4.16. EQ-E₂ dos extratos das amostras ozonizadas de 17β-estradiol/17α-etinilestradiol nos três valores de pH avaliados.

Da Figura 4.16 pode-se verificar que, em pH 3, os extratos das amostras ozonizadas apresentaram valores de EQ-E₂ iguais a zero, mesmo com a menor dosagem de ozônio utilizada (1,0 mg l⁻¹), mostrando que a atividade estrogênica foi completamente removida. Por outro lado, em pH 7 e 11, os valores de EQ-E₂ dos extratos das amostras de 17β-estradiol/17α-etinilestradiol diminuíram consideravelmente com o aumento da dosagem de ozônio, ou seja, a atividade estrogênica foi bastante reduzida, mas não completamente removida, mesmo com altas doses de ozônio (25 mg l⁻¹).

Verifica-se que, nas maiores concentrações de ozônio consumido avaliadas, os extratos das amostras de 17β-estradiol/17α-etinilestradiol apresentaram valor de EQ-E₂ próximos de 1 µg l⁻¹, o que significa que essas amostras possuíam um equivalente de estradiol na faixa de 2 ng l⁻¹, uma vez que as amostras foram concentradas 500 vezes na extração em fase sólida. Cabe ressaltar que essa concentração é capaz de causar diferenciação sexual e afetar a fecundidade de peixes (Fent *et al.*, 2006; Nash *et al.*, 2004).

Em pH 7, com a maior dosagem de ozônio avaliada (17,5 mg l⁻¹ de ozônio consumido) a amostra apresentou um equivalente de estradiol de 0,146 µg l⁻¹, o que significa uma redução no valor de EQ-E₂ de 99,9 %. Em pH 11, com 25,0 mg l⁻¹ de ozônio consumido a amostra apresentou um equivalente de estradiol de 0,424 µg l⁻¹, apresentando a mesma redução no valor de EQ-E₂ (99,9 %).

Verificou-se que, em pH 7 e 11, a dosagem de ozônio necessária para uma diminuição considerável da atividade estrogênica foi bastante alta. Portanto, a partir dos resultados existentes na literatura e dos obtidos nesse trabalho para remoção de atividade estrogênica, verifica-se uma grande dificuldade na remoção da estrogenicidade desses hormônios pelos diversos processos oxidativos existentes. Os ensaios realizados nesse trabalho mostraram que, a princípio, a ozonização em pH baixo é a técnica mais adequada na remoção da estrogenicidade, uma vez que em pH 3 a atividade estrogênica foi completamente removida.

Os resultados obtidos são de extrema importância no que diz respeito aos processos de tratamento de água para abastecimento que utilizam ozônio, uma vez que, em geral, são realizados no pH original da água (~ 6,5). As dosagens usualmente

aplicadas realmente podem levar a uma boa remoção dos estrogênios, mas não são suficientes para a remoção da atividade estrogênica, que é o efeito biológico não desejado.

4.2.2.2. Avaliação da Dosagem de Ozônio na Remoção da Atividade Estrogênica

Nas Figuras 4.13 a 4.15 pôde-se verificar a diminuição da atividade estrogênica com o aumento da dosagem de ozônio, porém, a estrogenicidade não foi completamente removida em pH 7 e 11, mesmo com altas doses de ozônio.

Conforme mencionado anteriormente, no ensaio YES a presença de estrogenicidade na amostra pode ser verificada pela mudança de coloração do substrato cromogênico de amarelo para vermelho. Quanto mais estrogênica a amostra, mais intensa a coloração avermelhada. A presença da coloração amarelada indica a ausência de compostos estrogênicos.

Na Figura 4.17 pode-se observar a diminuição da atividade estrogênica com o aumento da dosagem de ozônio para os extratos das amostras de 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol associados ozonizadas em pH 7, com dosagens de ozônio variando de $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (linhas A e C da placa A) a $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ (linhas E e G da placa B).

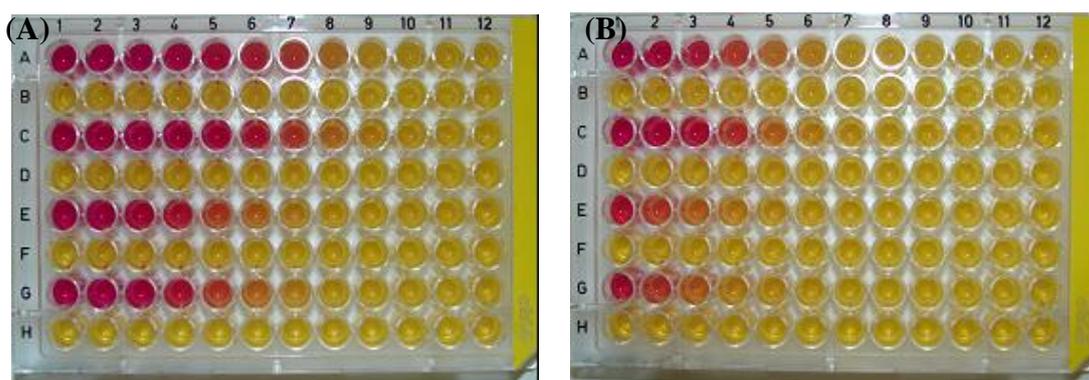


Figura 4.17. Microplacas de 96 poços com a resposta do ensaio YES dos extratos das amostras de 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol ozonizadas em pH 7 com: $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras A e C da placa A), $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras E e G da placa A), $5,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras A e C da placa B) e $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras E e G da placa B). As fileiras B, D, F e H são os brancos.

4.2.2.3. Avaliação do pH na Remoção da Atividade Estrogênica

Na Figura 4.18 têm-se as fotos das microplacas de 96 poços mostrando a resposta estrogênica do ensaio YES das amostras de 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol ozonizadas nos três valores de pH investigados. A placa A corresponde aos extratos das amostras ozonizadas em pH 3, enquanto a placa B apresenta os extratos das amostras em pH 7 e a placa C os resultados em pH 11.

Comparando-se as linhas A e C e E e G das três placas, verifica-se que a placa C, apresentou maior coloração avermelhada, mostrando que as amostras ozonizadas em pH 11 apresentaram menor remoção da atividade estrogênica. Para a placa A, ou seja, em pH 3, independentemente da dose de ozônio aplicada, a remoção da estrogenicidade foi completa.

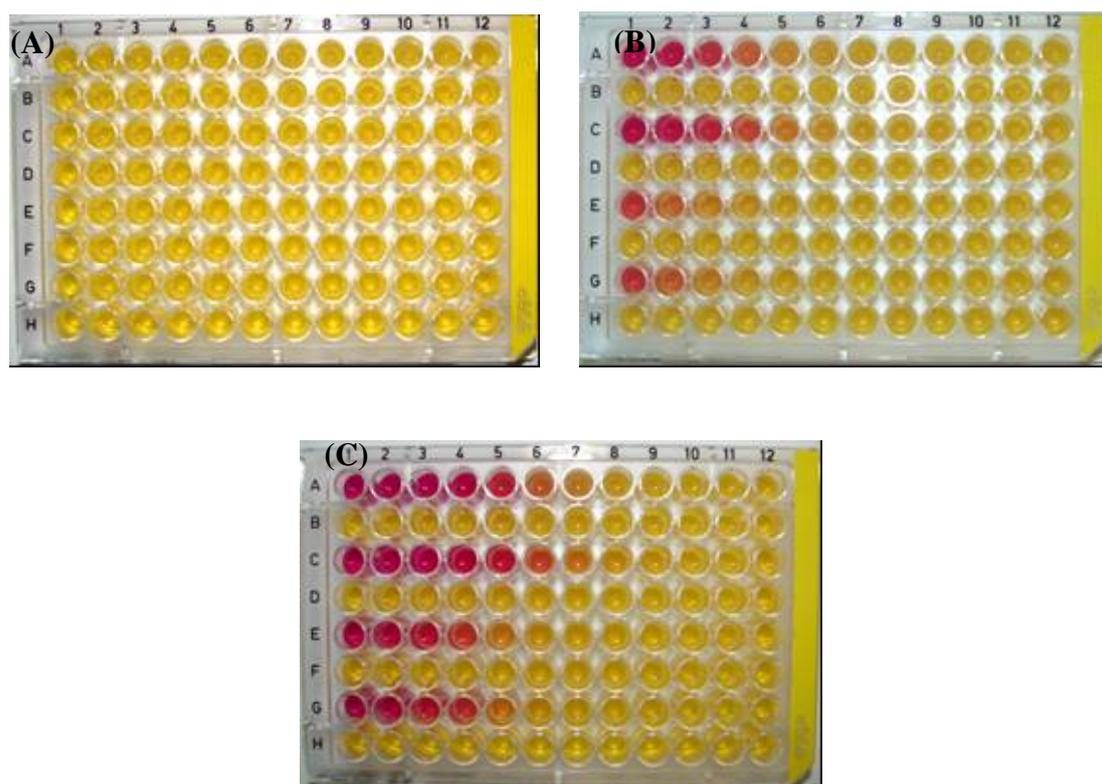


Figura 4.18. Microplacas de 96 poços com a resposta no ensaio YES dos extratos das amostras de 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol ozonizadas em: pH 3 e $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras A e C da placa A) e pH 3 e $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras E e G da placa A), pH 7 e $5,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras A e C da placa B) e pH 7 e $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras E e G da placa B), pH 11 e $6,0 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras A e C da placa C) e pH 11 e $15,0 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras E e G da placa C). As fileiras B, D, F e H são os brancos.

4.2.3. Comparação dos Processos de Ozonização e O_3/H_2O_2

Nas Figuras 4.19 a 4.22 é mostrada a comparação da atividade estrogênica dos extratos das amostras de 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol e de 17α -etinilestradiol tratadas por ozonização e O_3/H_2O_2 (razão molar $O_3:H_2O_2$ de 2:1) em pH 3 e 7. Não foi avaliada a remoção da atividade estrogênica pelo processo de O_3/H_2O_2 em pH 11 pois nesse valor de pH o ozônio é instantaneamente decomposto em radicais OH.

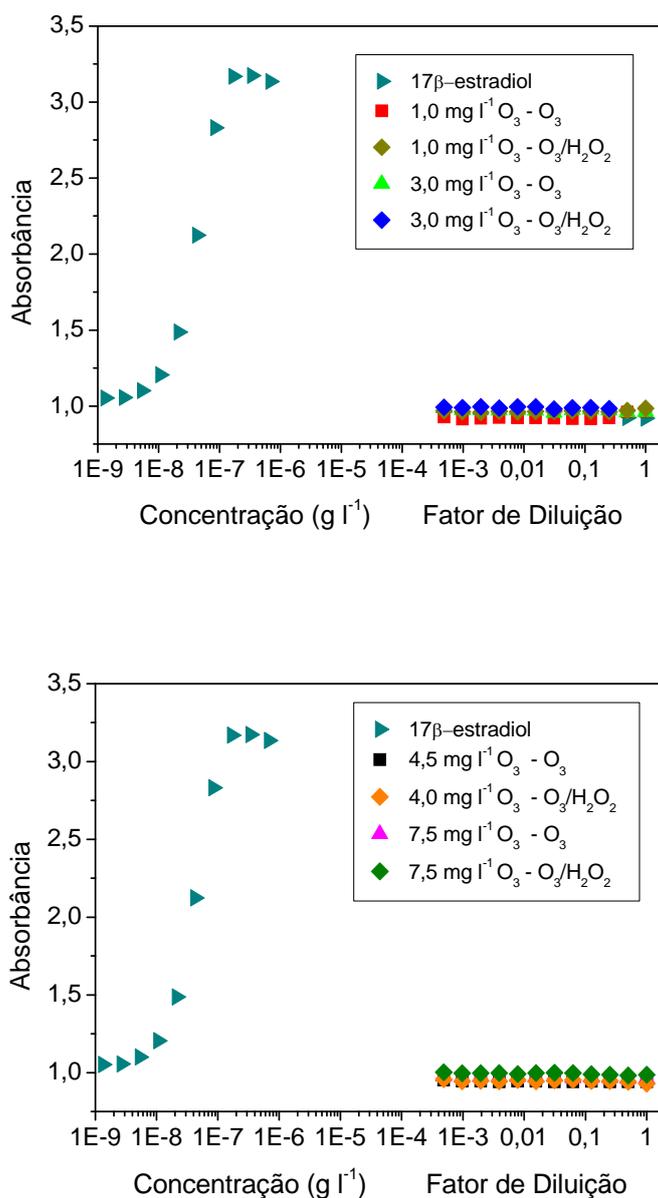


Figura 4.19. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol tratadas por O_3 e O_3/H_2O_2 em pH 3, obtidas pelo ensaio YES.

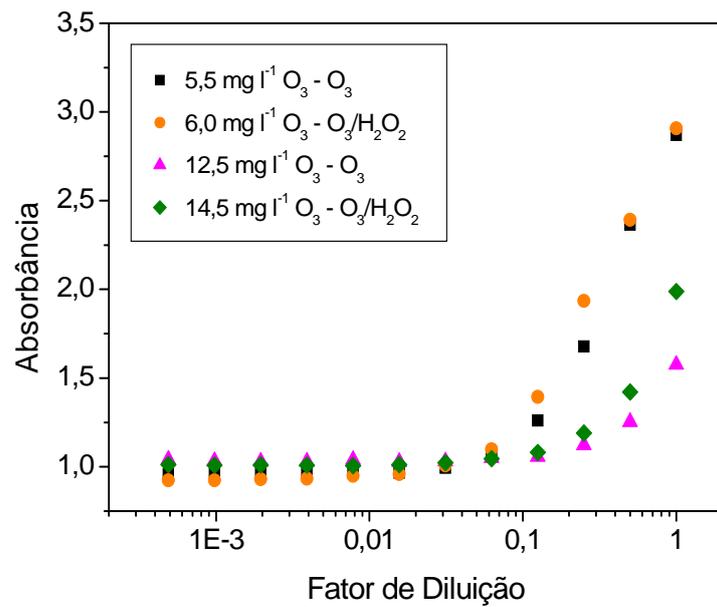
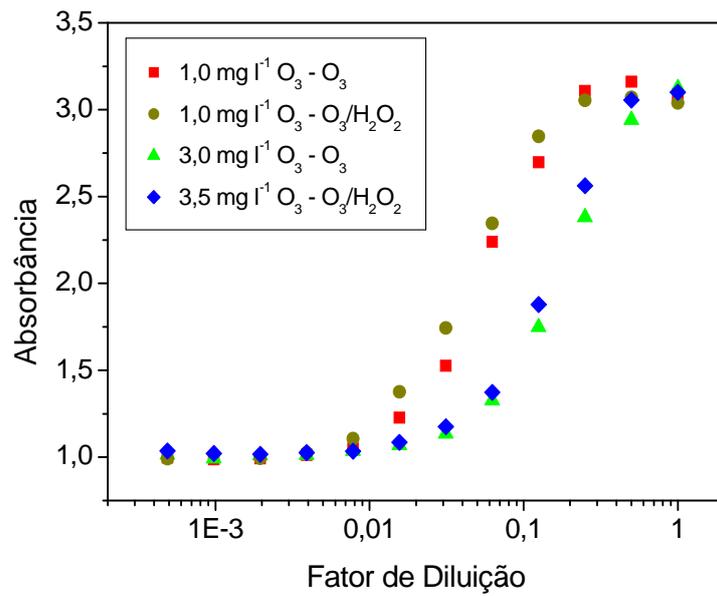


Figura 4.20. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol tratadas por O₃ e O₃/H₂O₂ em pH 7, obtidas pelo ensaio YES.

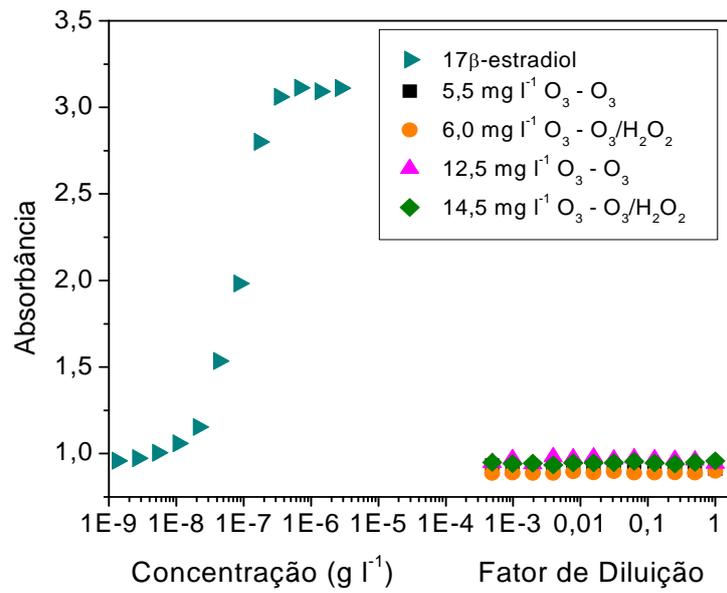
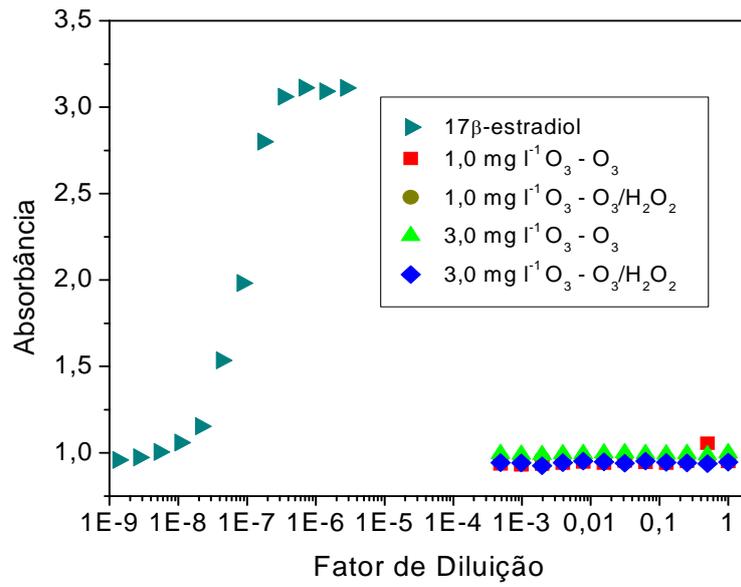


Figura 4.21. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17α-etinilestradiol tratadas por O₃ e O₃/H₂O₂ em pH 3, obtidas pelo ensaio YES.

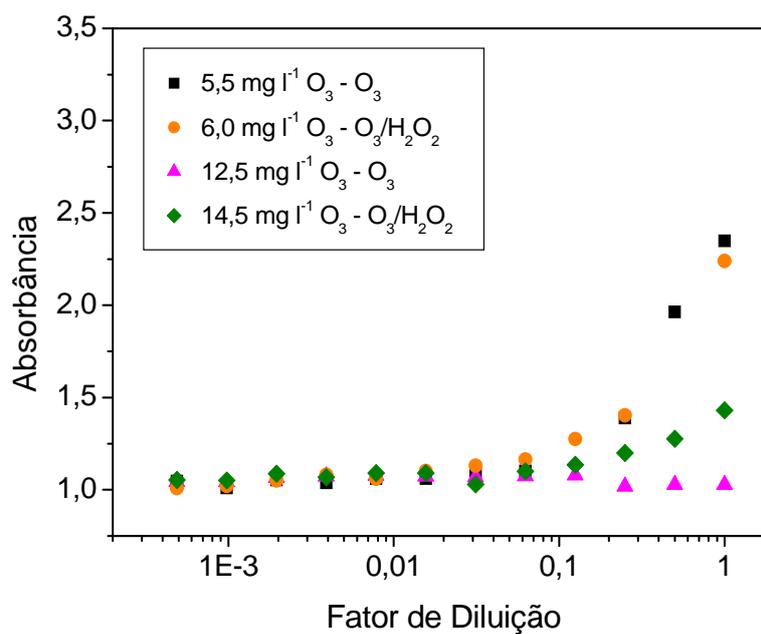
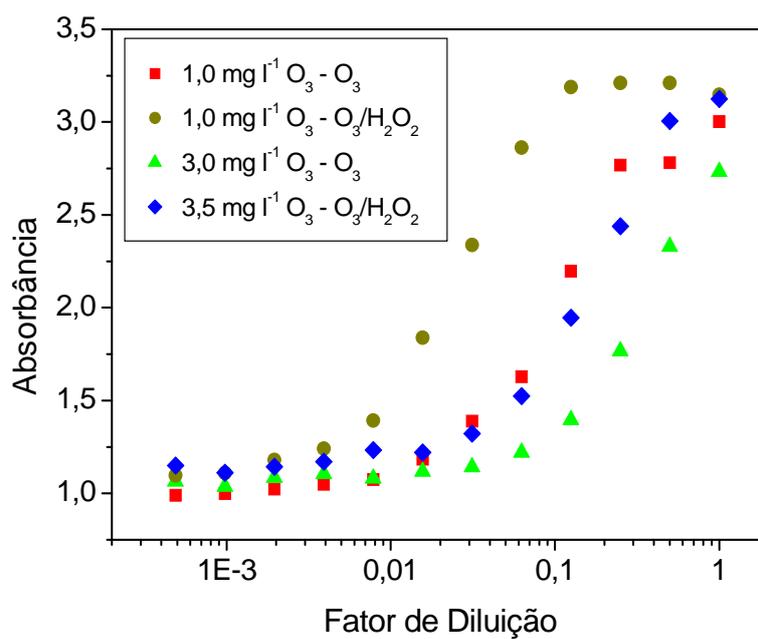


Figura 4.22. Comparação das curvas dose-respostas dos extratos das amostras de 17 α -etinilestradiol tratadas por O₃ e O₃/H₂O₂ em pH 7, obtidas pelo ensaio YES.

Em pH 3 não foi observada diferença na atividade estrogênica pelos processos de ozonização e O_3/H_2O_2 . Entretanto, em pH 7, no processo de O_3/H_2O_2 a estrogenicidade foi maior em relação a ozonização. Isso pode ser devido a dois motivos: ou os compostos formados possuem maior atividade estrogênica ou os subprodutos são formados em maior concentração. A segunda hipótese é a mais provável, uma vez que as espécies oxidantes são as mesmas e a única diferença é que se induziu uma maior formação de radicais OH.

Esse mesmo resultado foi obtido para a atividade estrogênica das amostras tratadas separadamente, ou seja, a maior atividade estrogênica das amostras tratadas por O_3/H_2O_2 em pH 7 e total remoção da atividade estrogênica das amostras tratadas por ozonização e O_3/H_2O_2 em pH 3, conforme pode ser observado nas Figuras 4.21 e 4.22.

Concluiu-se que a adição de peróxido de hidrogênio na razão molar O_3/H_2O_2 de 2:1 não resultou em melhoria ao processo de ozonização, uma vez que não possibilitou incrementos na remoção dos estrogênios e na remoção da atividade estrogênica. A Figura 4.23 mostra a foto das microplacas de 96 poços com a resposta do teste YES das amostras de 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol tratadas em pH 7 pelos dois processos oxidativos estudados, com o intuito de mostrar a maior resposta estrogênica apresentada pelas amostras oxidadas por O_3/H_2O_2 .

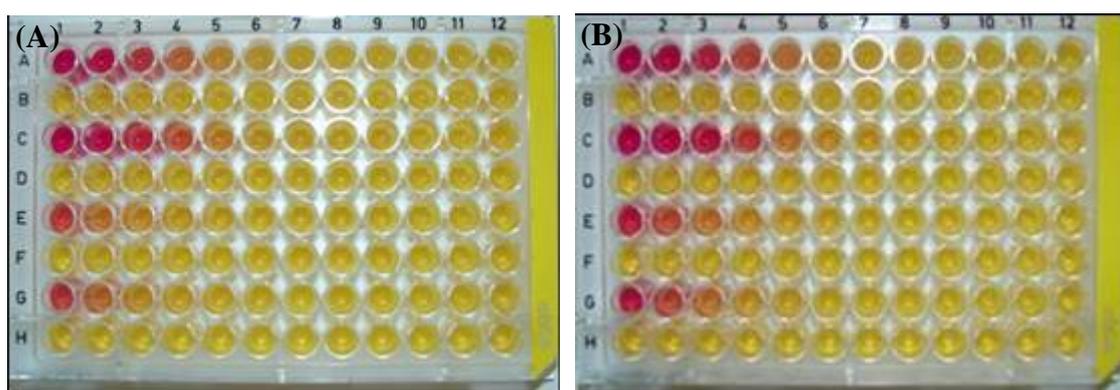


Figura 4.23. Microplacas de 96 poços com a resposta no ensaio YES dos extratos das amostras 17β -estradiol/ 17α -etinilestradiol tratadas em pH 7 por: O_3 com dosagem de $5,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras A e C da placa A) e O_3 com dosagem de $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras E e G da placa A) e O_3/H_2O_2 com dosagem de $6,0 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras A e C da placa B) e O_3/H_2O_2 com dosagem de $14,5 \text{ mg l}^{-1}$ de O_3 (amostras E e G da placa B). As fileiras B, D, F e H são os brancos.

4.2.4. Classificação com Base na Estrogenicidade

Os extratos das amostras de 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol, tratadas pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂ em valores de pH 3, 7 e 11, foram classificados com base na sua estrogenicidade em: altamente estrogênico, moderadamente estrogênico, fracamente estrogênico e não estrogênico, segundo o método utilizado por Andersen *et al.* (1999).

Para cada análise realizada, a resposta estrogênica de uma amostra foi classificada em altamente estrogênica quando a resposta obtida no teste YES foi maior que 75 %, moderadamente estrogênica quando a resposta foi de 75 a 25 %, fracamente estrogênica quando a resposta foi de 25 a 10 % e não estrogênica (ausente) quando a resposta (absorbância) esteve abaixo de 10 % da resposta obtida para o padrão 17 β -estradiol (Andersen *et al.*, 1999), conforme Figura 4.24.

Para o cálculo da porcentagem de estrogenicidade em relação a 17 β -estradiol, a absorbância foi corrigida, levando em consideração a absorbância do branco. A porcentagem de estrogenicidade em relação a 17 β -estradiol foi calculada pela Equação 4.1. Na Tabela 4.3 é apresentada a classificação realizada com base na estrogenicidade.

$$\%_{estrogenicidade} = \frac{A_{amostra} - A_{branco}}{A_{17\beta\text{-estradiol}} - A_{branco}} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

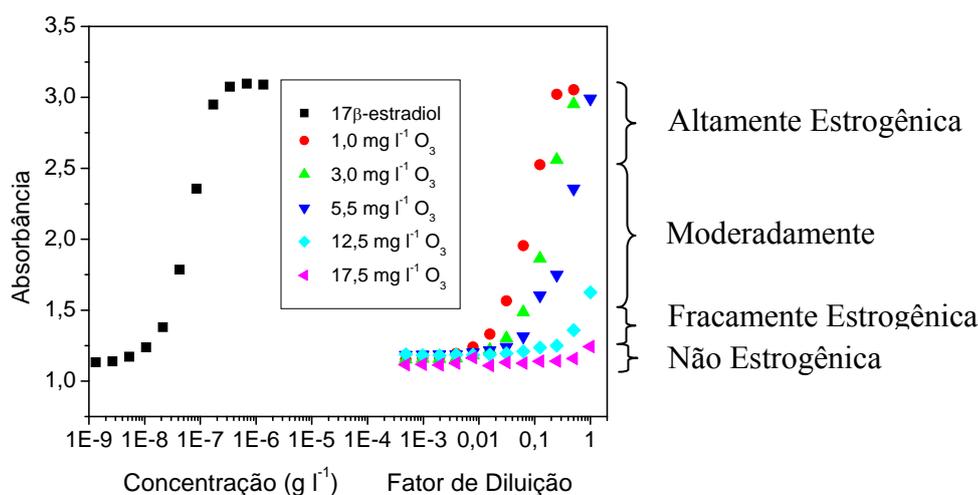


Figura 2.24. Classificação com base na estrogenicidade.

Tabela 4.3. Classificação das amostras oxidadas de 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol com base na estrogenicidade.

Processo	Ozônio Consumido (mg l⁻¹)	17β-estradiol	17α-etinilestradiol	17β-estradiol/17α-etinilestradiol
Ozonização pH 3	1,0	Ausente	Ausente	Ausente
	3,0	Ausente	Ausente	Ausente
	4,5	Ausente	Ausente	Ausente
	7,5	Ausente	Ausente	Ausente
O ₃ /H ₂ O ₂ pH 3	1,0	Ausente	Ausente	Ausente
	3,0	Ausente	Ausente	Ausente
	4,0	Ausente	Ausente	Ausente
	7,5	Ausente	Ausente	Ausente
Ozonização pH 7	1,0	Altamente	Altamente	Altamente
	3,0	Altamente	Altamente	Altamente
	5,5	Moderadamente	Moderadamente	Altamente
	12,5	Fracamente	Ausente	Moderadamente
	17,5	NA	NA	Fracamente
O ₃ /H ₂ O ₂ pH 7	1,0	Altamente	Altamente	Altamente
	3,5	Altamente	Altamente	Altamente
	6,0	Moderadamente	Moderadamente	Altamente
	14,5	Moderadamente	Moderadamente	Moderadamente
	19,5	NA	NA	NA
Ozonização pH 11	1,0	Altamente	Altamente	Altamente
	3,5	Altamente	Altamente	Altamente
	6,0	Altamente	Altamente	Altamente
	15,0	Moderadamente	Fracamente	Altamente
	20,0	NA	NA	Moderadamente
	25,0	NA	NA	Moderadamente

NA – não avaliada

Da Tabela 4.3 pode-se verificar que em pH 3 a atividade estrogênica foi completamente removida, independentemente do processo oxidativo utilizado: ozonização ou O_3/H_2O_2 , tanto para os estrogênios tratados separadamente, quanto em mistura. Por outro lado, os extratos das amostras oxidadas em pH 7 e 11 apresentaram-se fortemente estrogênicos, sendo que a estrogenicidade diminuiu com o aumento da dosagem de ozônio mas não foi totalmente removida até as dosagens de ozônio aplicadas. A atividade estrogênica da mistura foi maior que dos estrogênios tratados separadamente devido à maior concentração inicial de estrogênios na mistura.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho (alta remoção dos estrogênios nos três valores de pH, maior atividade estrogênica para o processo de O_3/H_2O_2 em relação a ozonização e maior atividade estrogênica em pH 7 e 11 que em pH 3), sugere-se que a oxidação via radical OH leve à formação de subprodutos com maior estrogenicidade que a oxidação via ozônio molecular.

4.2.5. Efeito do Radical OH na Redução da Atividade Estrogênica

Com o intuito de verificar se a oxidação via radical OH levou a formação de intermediários com atividade estrogênica, testes de ozonização foram realizados na presença e ausência de terc-butanol, um capturador de radicais OH. Foi utilizada uma concentração de terc-butanol de $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Os resultados são apresentados na Figura 4.25.

Verificou-se que, nos pH 7 e 11, com a adição do capturador de radicais OH, houve uma menor remoção dos estrogênios (conforme Figuras 4.8B e 4.8C) e as amostras apresentaram uma maior atividade estrogênica, conforme pode ser observado nas Figuras 4.25B e 4.25C. Isso ocorreu porque não houve a atuação de uma parte dos radicais OH na oxidação dos estrogênios. Portanto, a maior atividade estrogênica apresentada com a utilização do capturador de radicais OH provavelmente deve-se à maior quantidade de estrogênios remanescentes, uma vez que a quantidade de oxidante atuante foi menor.

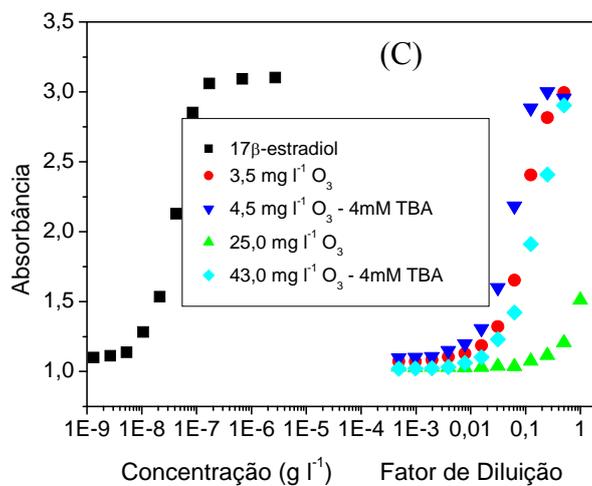
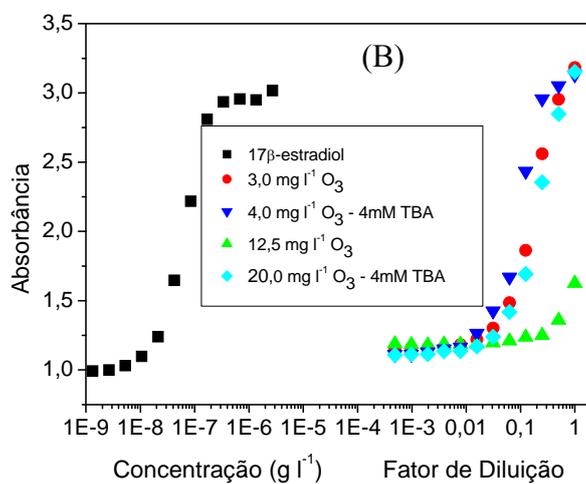
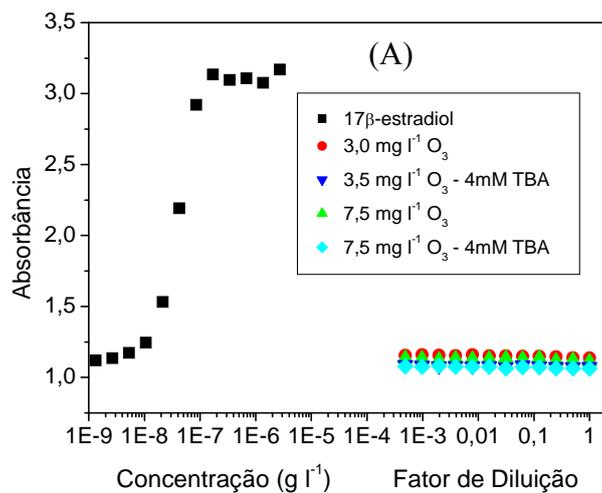


Figura 4.25. Comparação das curvas dose-respostas de 17β-estradiol e dos extratos das amostras da mistura 17β-estradiol/17α-etinilestradiol ozonizadas na presença e ausência do capturador de radicais OH (TBA) em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

Em pH 3, tanto para a ozonização quanto para o processo de O_3/H_2O_2 , não houve alteração na remoção dos estrogênios (conforme Figura 4.8A) e na atividade estrogênica (conforme pode ser observado na Figura 4.25A) com a utilização do capturador de radicais OH. Isso mostra que o radical OH não foi formado em pH 3, nem para o processo de O_3/H_2O_2 , ou seja, não houve a atuação desse radical durante a oxidação dos estrogênios pelos processos de ozonização e de O_3/H_2O_2 em pH 3.

A não atuação dos radicais OH em pH 3, mesmo para o processo de O_3/H_2O_2 , é devida à pequena produção de radicais OH em condições ácidas, uma vez que a base conjugada de peróxido de hidrogênio, que é formada em altos valores de pH, é a espécie que reage com o ozônio na formação dos radicais OH (Staehelin and Hoigné, 1982). Portanto, provavelmente a atividade estrogênica dos intermediários formados em pH 7 e 11 está associada a oxidação via radical OH. Com o objetivo de comprovar essa hipótese, foram também identificados alguns intermediários formados durante a ozonização nos diversos valores de pH, mostrados no item 4.5.

Verifica-se que, no estudo da degradação de desreguladores endócrinos em níveis de $\mu g\ l^{-1}$ ou $ng\ l^{-1}$, a análise química deve ser realizada em conjunto com análises *in vitro* e/ou *in vivo*, pois apesar da alta remoção obtida foi observado que a atividade estrogênica não foi completamente removida. Em suma, a avaliação somente com análises químicas não deve ser utilizada para avaliar a remoção de micropoluentes de amostras aquosas ambientais.

4.3. Espectrometria de UV

A atividade estrogênica de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol está relacionada às suas estruturas químicas. A posição relativa do grupo hidroxila fenólico (OH) no anel é considerada crucial para a alta afinidade da ligação com o receptor de estrogênio e assim apresentar o potencial estrogênico.

De acordo com a literatura, as bandas de absorvância de uma substância na faixa de comprimento de onda de 190 a 300 nm representam as ligações duplas e triplas conjugadas da molécula e a banda de absorvância no comprimento de onda de 288 nm

representa o anel fenólico (Liu e Liu, 2004), conforme Figura 4.26. Portanto, fazendo varreduras de UV nessa faixa de comprimento de onda pode-se verificar se ocorre a diminuição dos picos de absorbância dos estrogênios, indicando o rompimento do anel fenólico.

Pelos espectros de UV de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol em metanol (Figura 4.26) foi possível verificar que essas moléculas apresentam um maior pico de absorbância em $\lambda = 203$ nm e um menor pico em $\lambda = 280$ nm. O metanol foi utilizado como solvente, pois no trabalho de Bila (2005) foi verificado que o metanol é o melhor solvente para identificar os picos de absorbância nos ensaios de espectrometria de UV com estrogênios.

Cabe ressaltar que a obtenção dos espectros de UV das amostras ozonizadas em concentrações tão baixas de estrogênios só foi conseguida uma vez que as amostras foram concentradas (250 vezes) na extração em fase sólida em cartuchos de C_{18} e posteriormente eluídas em solvente orgânico (metanol). Seria impossível a obtenção dos espectros de UV sem a concentração desses estrogênios.

Nas Figuras 4.27 e 4.28 têm-se as varreduras de UV das amostras de 17β -estradiol tratadas por ozonização e O_3/H_2O_2 nos três valores de pH investigados, enquanto que nas Figuras 4.29 e 4.30, as varreduras das amostras de 17α -etinilestradiol tratadas nessas mesmas condições.

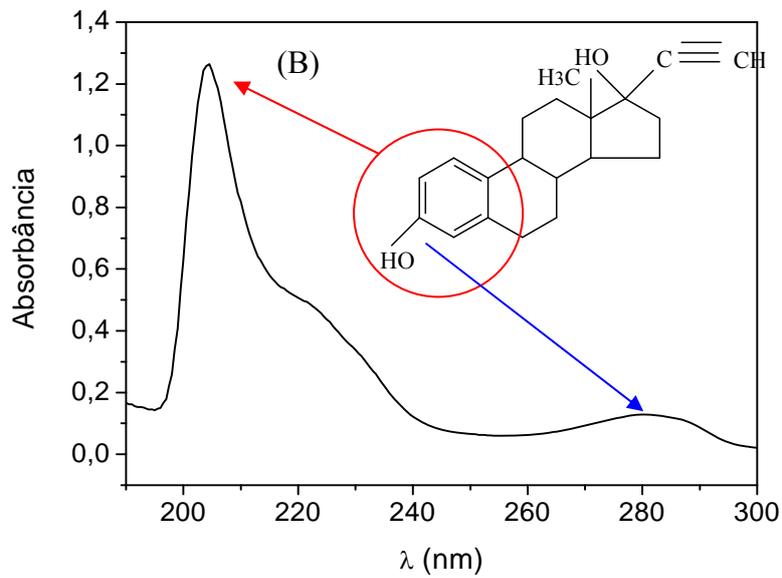
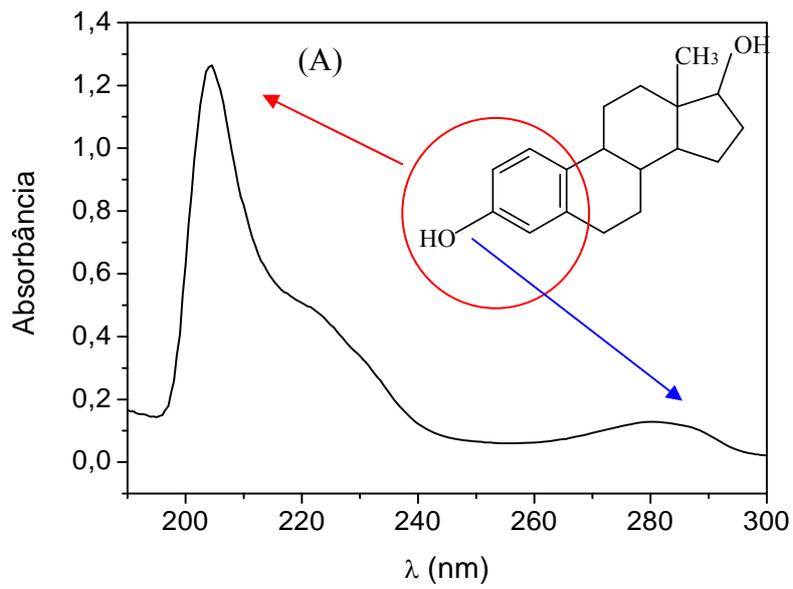


Figura 4.26. Espectros de absorvância dos estrogênios (A) 17 β -estradiol e (B) 17 α -etinilestradiol.

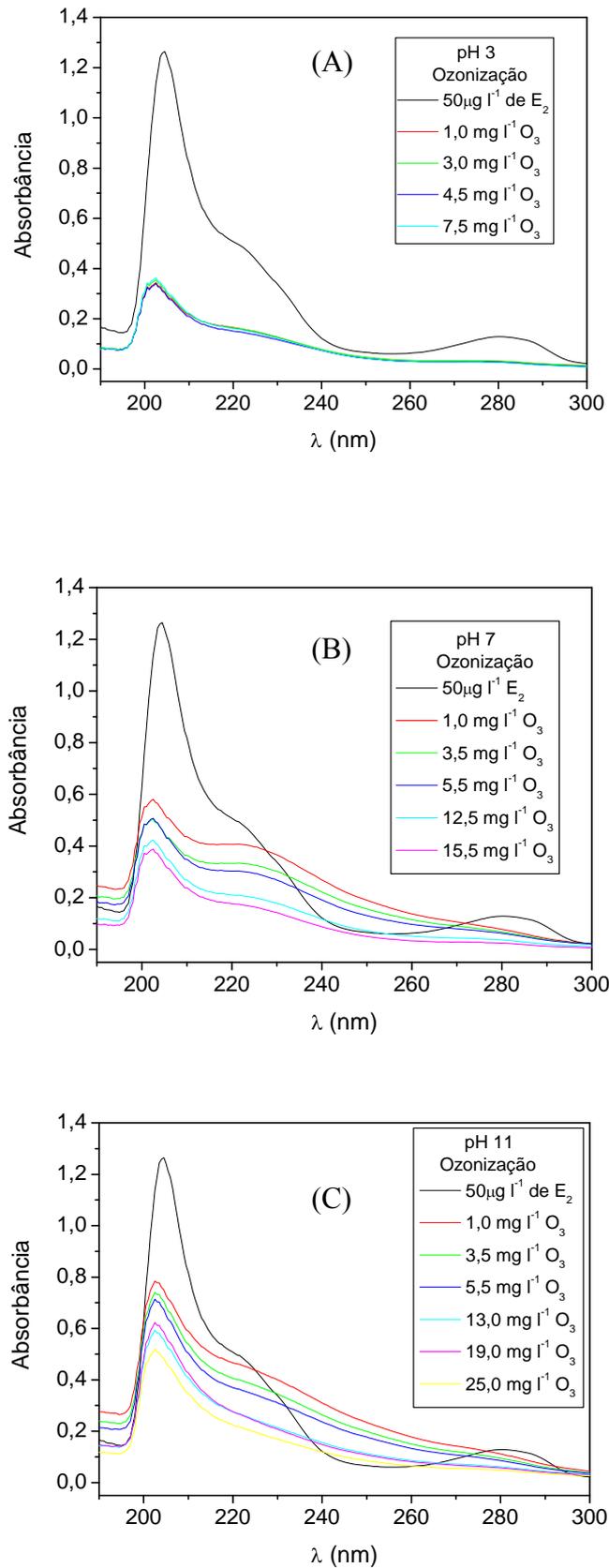


Figura 4.27. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17β -estradiol ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

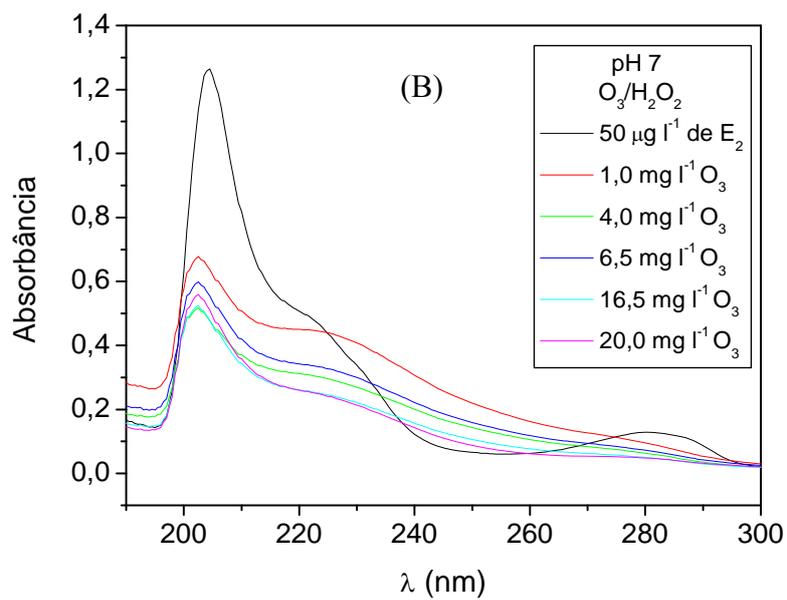
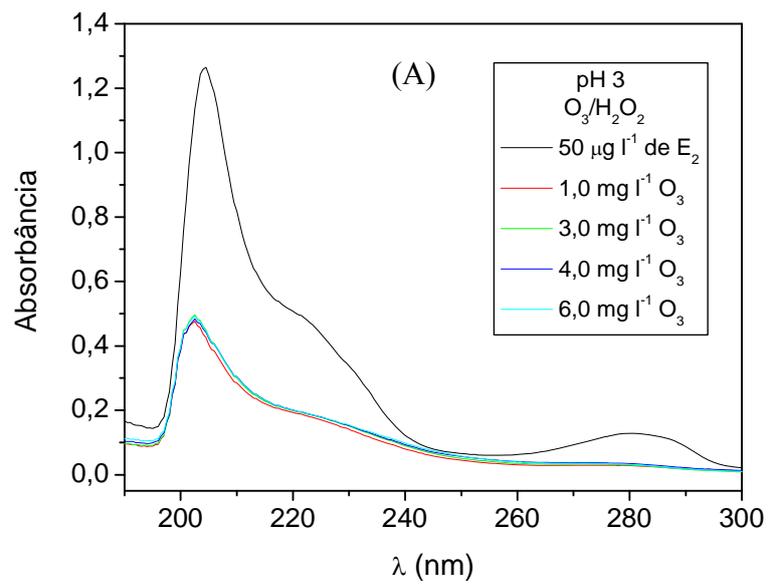


Figura 4.28. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17β-estradiol tratadas por O₃/H₂O₂ em (A) pH 3 e (B) pH 7.

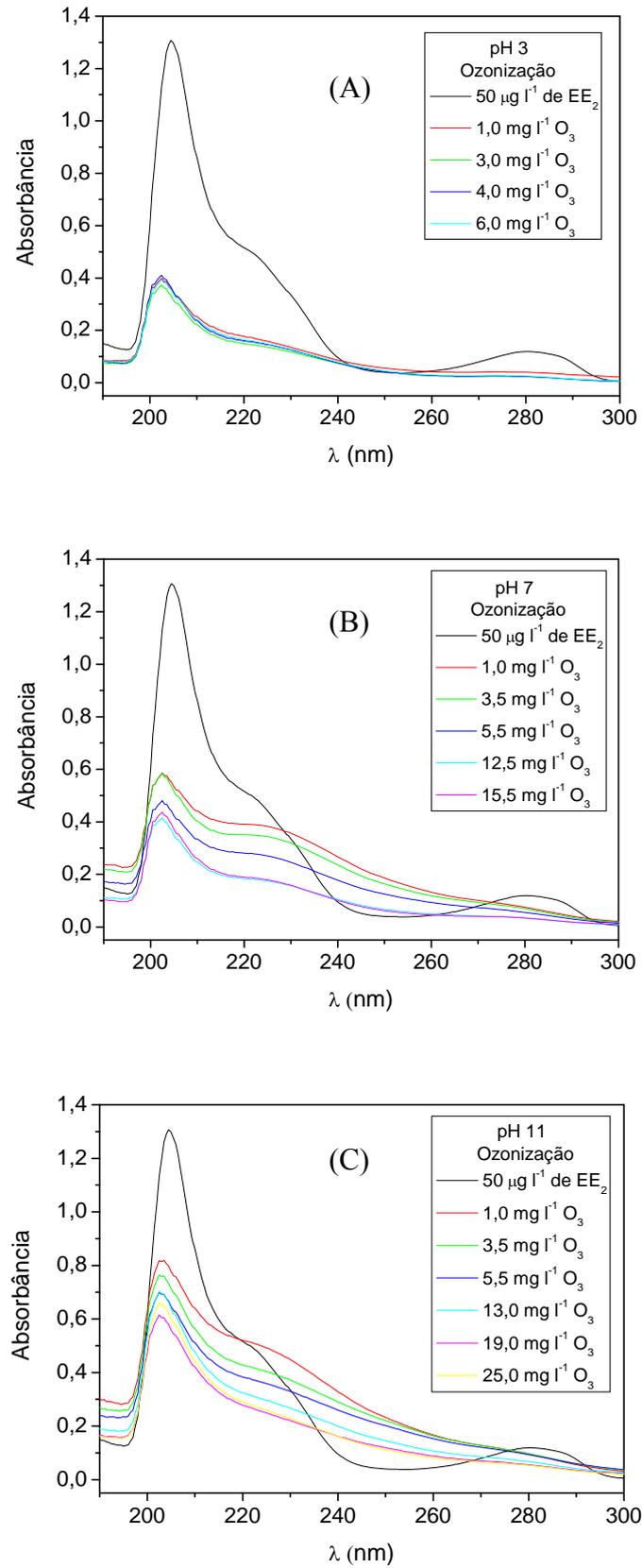


Figura 4.29. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17α -etinilestradiol ozonizadas em (A) pH 3, (B) pH 7 e (C) pH 11.

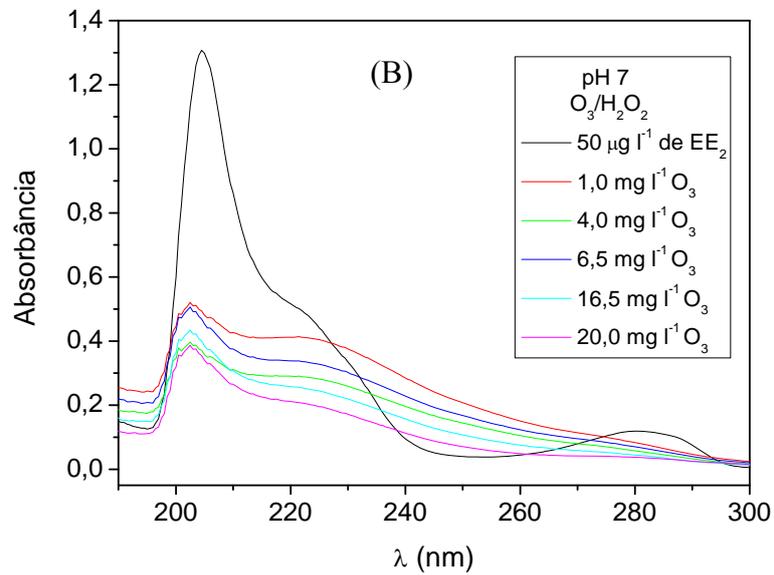
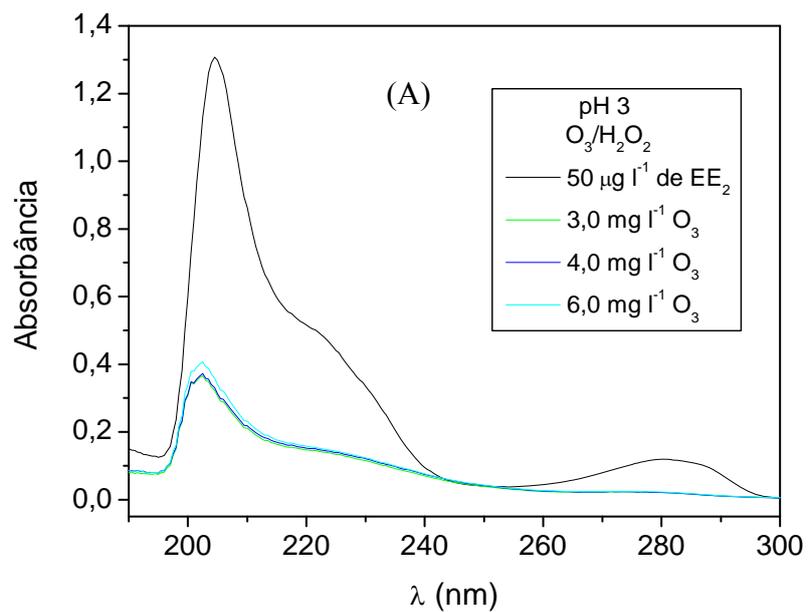


Figura 4.30. Espectros de absorvância das amostras aquosas de 17α -etinilestradiol tratadas por O_3/H_2O_2 em (A) pH 3 e (B) pH 7.

Os espectros de varredura no UV mostraram uma diminuição acentuada das bandas de absorvâncias de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol nos valores de pH investigados. As bandas de absorvância diminuíram com o aumento da dosagem de ozônio, mostrando o aumento da degradação dos estrogênios, especificamente no anel fenólico.

As bandas de absorvância em 203 e 280 nm de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol reduziram significativamente após os processos de ozonização e O₃/H₂O₂. Isso indica que o anel fenólico foi rompido. Conseqüentemente, houve a diminuição da estrogenicidade das amostras, uma vez que o anel fenólico é responsável pela estrogenicidade.

Comparando-se os picos de absorvância nos três valores de pH verifica-se que em pH 3 houve uma maior redução desses picos, enquanto que em pH 11 essa redução foi menor. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos para a atividade estrogênica, uma vez em pH 3 a atividade foi completamente removida e em pH 11 a atividade estrogênica residual foi maior, mostrando que realmente a atividade estrogênica está ligada ao anel fenólico.

Portanto, se a ruptura do anel fenólico resulta na remoção da atividade estrogênica, verifica-se que, em processos de tratamento de águas e efluentes não é necessária a oxidação dos estrogênios até a completa mineralização de suas moléculas.

4.4. Análise de Carbono Orgânico Dissolvido

Com o objetivo de verificar se a ozonização foi capaz de mineralizar os estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, ou seja, transformar o carbono orgânico em CO₂ e água, amostras da mistura desses estrogênios (concentração inicial de 200 μ g l⁻¹ de cada estrogênio) foram ozonizadas em pH 7 e analisadas em um analisador de Carbono Orgânico Total.

Na Figura 4.31 tem-se o resultado da análise de carbono orgânico dissolvido realizada após a ozonização da mistura de estrogênios.

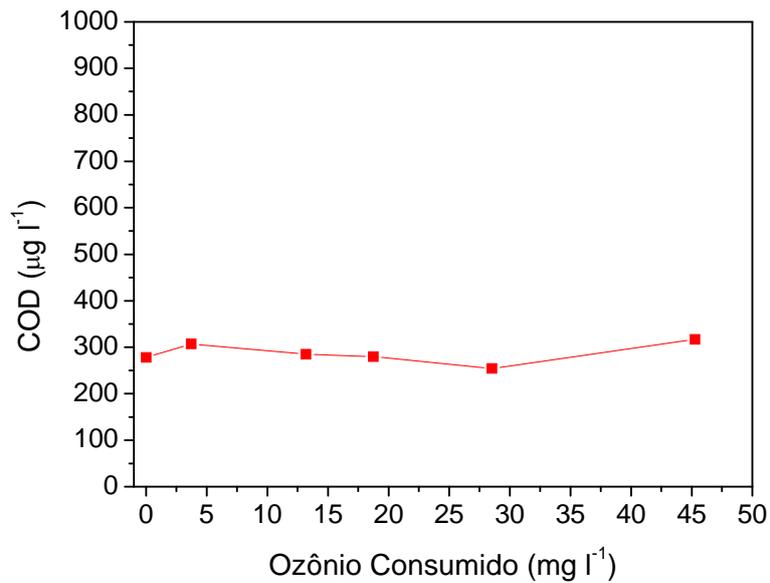


Figura 4.31. Carbono orgânico dissolvido em função do ozônio consumido da amostra de 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol ozonizada em pH 7 (concentração inicial de 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cada estrogênio).

Verificou-se que a metodologia utilizada não foi apropriada para a obtenção do carbono orgânico dissolvido. Os resultados apenas indicaram que o carbono orgânico dissolvido manteve-se praticamente constante desde o início da ozonização até o final, ou seja, ele não foi removido, independente da concentração de ozônio consumido, mostrando que, provavelmente, não houve a mineralização dos estrogênios durante a ozonização.

Entretanto, como os estrogênios reagem nos organismos com receptores específicos, a transformação das moléculas pelos oxidantes (ozônio molecular e radicais OH) pode ser suficiente para reduzir o efeito dessas substâncias, não sendo necessária a mineralização completa desses estrogênios. Com o objetivo de verificar se houve a transformação das moléculas de estrogênios em substâncias menos prejudiciais à vida humana e animal, foram identificados alguns subprodutos formados durante a ozonização desses estrogênios, mostrados no item a seguir.

4.5. Intermediários Propostos

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura onde são propostos os subprodutos formados na oxidação dos estrogênios (Bila *et al.*, 2007; Irmak *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2004; Ohko *et al.*, 2002). Entretanto, é um tópico do trabalho muito importante, a partir do momento que se deseja verificar se a atividade estrogênica remanescente das amostras oxidadas é devida a esses subprodutos formados.

Para a identificação dos intermediários formados durante a ozonização, soluções de 1 mg l⁻¹ de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol foram ozonizadas nos três valores de pH (3, 7 e 11). Essa maior concentração foi utilizada para permitir a formação de uma maior quantidade dos intermediários, facilitando o processo de identificação.

Vários intermediários foram formados durante a ozonização de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol, entretanto poucos puderam ser propostos. As bibliotecas utilizadas para a identificação dos intermediários foram a Nist e a Wiley 275. Essas bibliotecas indicaram uma variedade de substâncias químicas formadas, porém, com base nas estruturas de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol e nos seus possíveis produtos de oxidação, muitos compostos identificados pelas bibliotecas foram descartados.

As bibliotecas Nist e Wiley 275 podem ter indicado substâncias que apresentam estruturas semelhantes às formadas durante a ozonização de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol, uma vez que as bibliotecas não possuem os espectros de massa de todas as substâncias químicas existentes. A maior dificuldade foi encontrada para os subprodutos formados durante a ozonização de 17α-etinilestradiol, uma vez que existem menos espectros de massa de substâncias com estruturas químicas similares à desse estrogênio.

Diferentes subprodutos foram formados nos diversos valores de pH, devido a diferentes mecanismos de reação entre os estrogênios e os oxidantes atuantes (ozônio molecular e radical OH), uma vez que, durante a ozonização, a ação do ozônio molecular ou do radical OH é dependente do pH da solução.

4.5.1. Intermediários Propostos na Ozonização de 17 β -Estradiol

Na Figura 4.32 é apresentada a estrutura de 17 β -estradiol formada após a derivatização com BSTFA. Pode-se verificar, pela estrutura formada, que houve a derivatização dos dois grupos -OH da molécula desse estrogênio, formando Bis(trimetilsilil)estradiol, mostrando que o processo de derivatização foi eficiente.

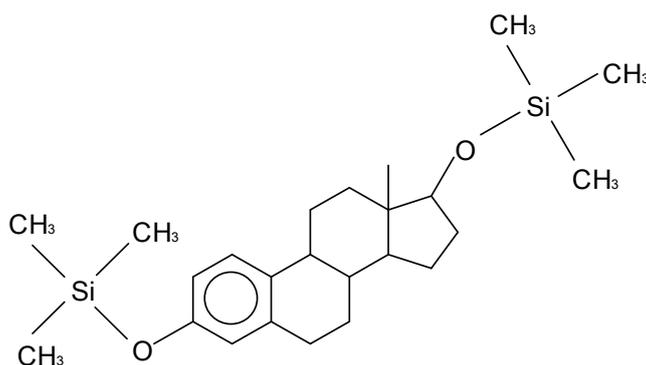


Figura 4.32. Estrutura de 17 β -estradiol formada após derivatização com BSTFA.

O espectro de massa de 17 β -estradiol (derivatizado) obtido da CG/EM e o espectro de massa de Bis(trimetilsilil)estradiol obtido da biblioteca Nist são apresentados na Figura 4.33. Os espectros de massa de 17 β -estradiol derivatizado e de Bis(trimetilsilil)estradiol apresentam os íons m/z 73, 129, 232, 285, 326 e 416. A similaridade entre 17 β -estradiol derivatizado e Bis(trimetilsilil)estradiol foi de 93,7 %.

Por meio dos espectros de massa e das bibliotecas Nist e Wiley 275 foram propostos para a ozonização de 17 β -estradiol os intermediários mostrados na Tabela 4.4. Verifica-se que somente foram identificados intermediários em pH 7 e 11; em pH 3 não. A explicação para a formação de diferentes subprodutos nos diversos valores de pH avaliados deve-se a diferentes mecanismos de reação entre os estrogênios e os oxidantes atuantes, uma vez que em pH ácido há atuação somente do ozônio molecular, em pH básico há atuação somente dos radicais OH enquanto que em pH neutro ambos oxidantes podem estar atuando.

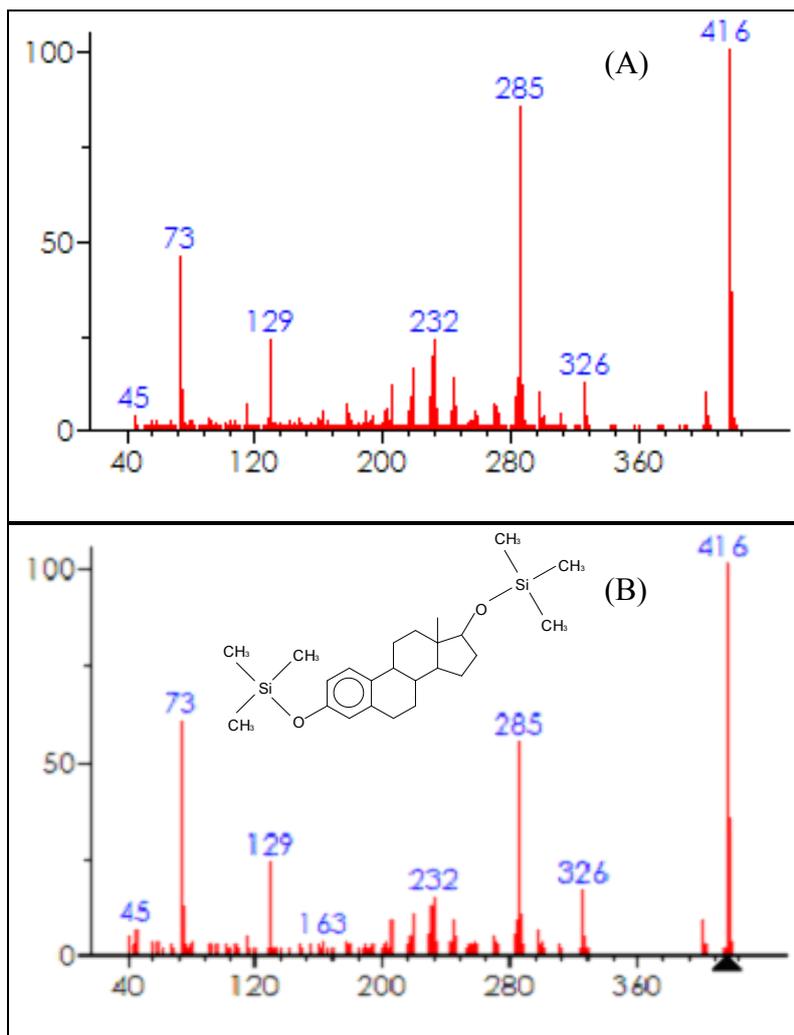
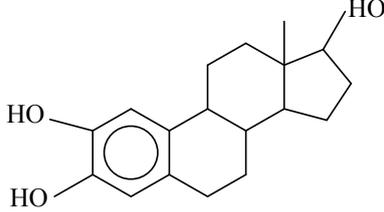
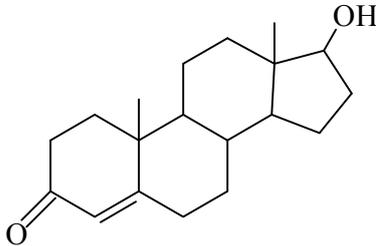


Figura 4.33. Espectros de massa de (A) 17β-estradiol (derivatizado) obtido pelo CG/EM e de (B) Bis(trimetilsilil)estradiol obtido da biblioteca Nist.

Os intermediários propostos para a ozonização de 17β-estradiol foram 2-hidroxiestradiol e testosterona, com similaridades de 99 % e 62,5 %, respectivamente. Esses intermediários também foram propostos por Ohko *et al.* (2002) durante a fotocatalise de 17β-estradiol e por Bila *et al.* (2007) durante a ozonização de 17β-estradiol. Irmak *et al.* (2005) propuseram mecanismos para a reação direta do ozônio com o anel fenólico de 17β-estradiol e também verificaram que 2-hidroxiestradiol é formado durante a ozonização.

Tabela 4.4. Subprodutos propostos na ozonização de 17 β -estradiol nos diferentes valores de pH investigados.

Intermediários Propostos	pH 3	pH 7	pH 11
 <p>2 – Hidroxiestradiol</p>	ND	√	√
 <p>Testosterona</p>	ND	√	√

ND: não detectado

Verifica-se que, dos intermediários propostos para a ozonização de 17 β -estradiol, 2-hidroxiestradiol possui o anel fenólico capaz de se ligar ao receptor de estrogênio e elucidar a resposta estrogênica, devendo, portanto, apresentar estrogenicidade, enquanto que testosterona não apresenta o anel fenólico, devendo ser uma substância não estrogênica.

Bila (2005) verificou a estrogenicidade das substâncias 2-hidroxiestradiol e testosterona e observou que 2-hidroxiestradiol possui um potencial estrogênico 10 vezes menor que o potencial de 17 β -estradiol, enquanto que a testosterona não apresentou estrogenicidade pelo ensaio YES. Portanto, 2-hidroxiestradiol pode estar contribuindo para a estrogenicidade residual das amostras de 17 β -estradiol e da mistura 17 β -estradiol/17 α -etinilestradiol ozonizadas em pH 7 e 11.

4.5.2. Intermediários Propostos na Ozonização de 17 α -etinilestradiol

Na Figura 4.34 é apresentada a estrutura de 17 α -etinilestradiol formada após a derivatização com BSTFA. Pode-se verificar, pela estrutura formada, que houve a derivatização dos dois grupos -OH da molécula de 17 α -etinilestradiol.

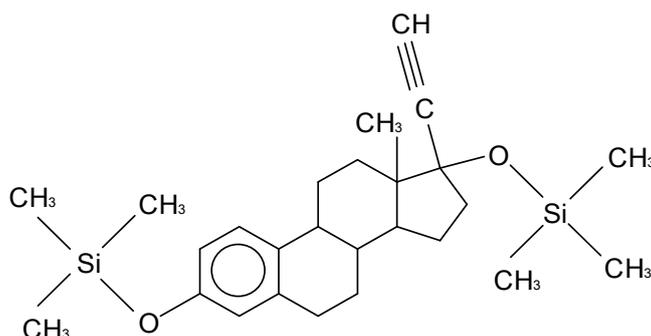


Figura 4.34. Estrutura de 17 α -etinilestradiol formada após derivatização com BSTFA.

O espectro de massa de 17 α -etinilestradiol (derivatizado) obtido da CG/EM e o espectro de massa do 19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ine,3,17-bis(trimetilsilil)oxi-(17 α) obtido da biblioteca Nist são apresentados na Figura 4.35. Os espectros de massa dessas duas substâncias apresentam os íons característicos m/z 73, 196, 232, 285 e 425. A similaridade encontrada entre 17 α -etinilestradiol derivatizado e 19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ine,3,17-bis(trimetilsilil)oxi-(17 α) foi de 96,6 %.

Os intermediários propostos para a ozonização de 17 α -etinilestradiol são mostrados na Tabela 4.5. As similaridades encontradas para as substâncias Estra-1,3,5(10)-trien-17-one,2,3-bis[(trimetil)oxi] e Estra-1,3,5(10)-trien-17-one,3,4-bis[(trimetil)oxi] foram de 90 % e 70 %, respectivamente.

Não foi possível identificar intermediários em pH 3 para a ozonização de 17 α -etinilestradiol. Verificou-se que diferentes subprodutos foram formados nos diferentes valores de pH avaliados, ou seja, intermediários formados em pH 7 e 11 não foram identificados em pH 3, possivelmente devido aos diferentes mecanismos de reação entre os estrogênios e os oxidantes atuantes.

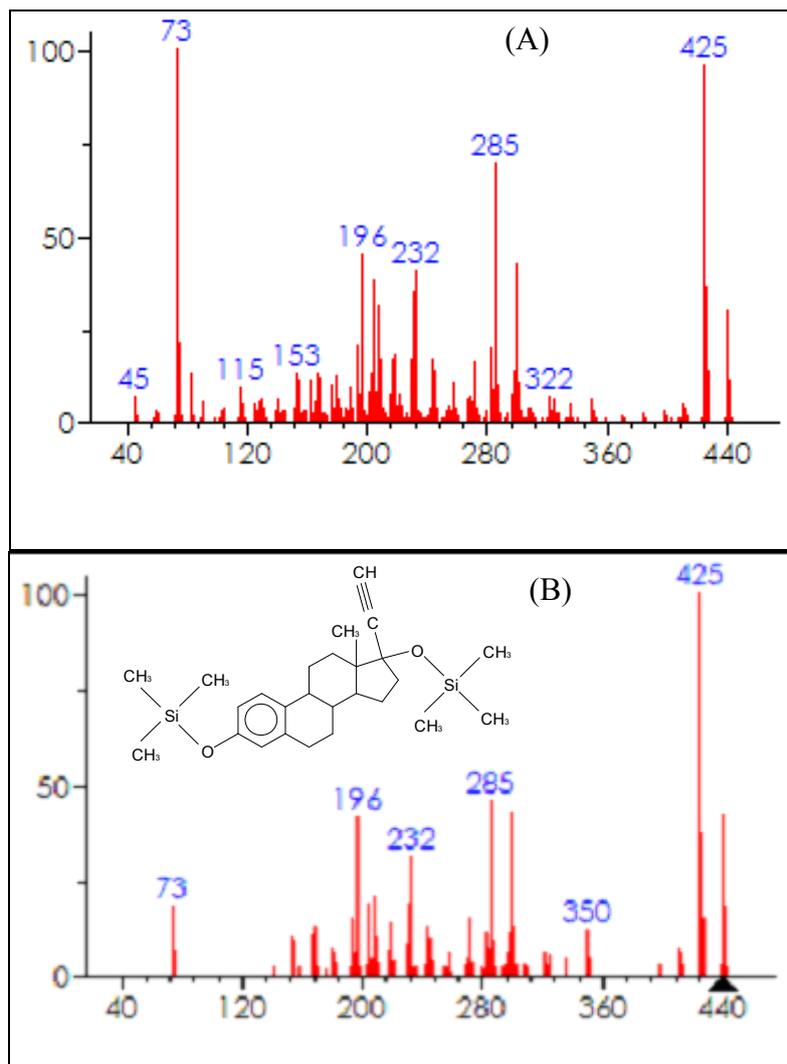
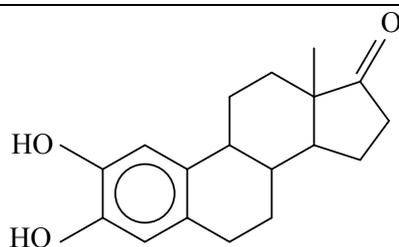
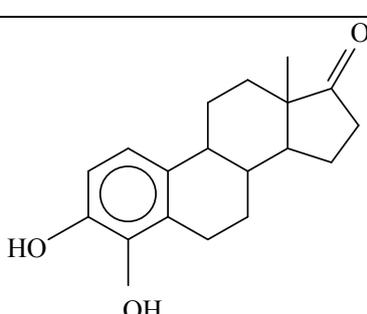


Figura 4.35. Espectro de massa do (A) 17 α -etinilestradiol (derivatizado) obtido pelo CG/EM e (B) 19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ine,3,17-bis (trimetilsilil) oxi-(17 α) obtido da biblioteca Nist.

Verifica-se que os dois intermediários propostos para a ozonização de 17 α -etinilestradiol são estruturas isômeras de posição. Segundo Pezella *et al.* (2004) o anel fenólico com radical apresenta estruturas ressonantes e, portanto, a reação do ozônio com o radical pode resultar na incorporação do radical OH em qualquer uma dessas duas posições no anel fenólico.

Tabela 4.5. Subprodutos propostos na ozonização de 17 α -etinilestradiol nos diferentes valores de pH investigados.

Intermediários Propostos	pH 3	pH 7	pH 11
 <p>Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 2,3-bis[(trimetil)oxi]</p>	ND	√	√
 <p>Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3,4-bis[(trimetil)oxi]</p>	ND	ND	√

ND: não detectado

Huber *et al.* (2004) identificaram alguns subprodutos formados na ozonização de 17 α -etinilestradiol. Duas porções da molécula podem ser primeiramente oxidadas pelo ozônio: o anel fenólico de 17 α -etinilestradiol que é altamente reativo com o ozônio ($k_{O_3} = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em pH 7) e o grupamento etinil que possui uma significativa menor reatividade ($k_{O_3} = 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Em baixas concentrações de ozônio, esse oxidante não reage com o grupo etinil e como consequência, somente o grupamento fenólico é degradado. Para facilitar a identificação dos subprodutos de oxidação, dois compostos modelos foram usados para representar a oxidação dessas duas porções da molécula de 17 α -etinilestradiol: THN e ECH, conforme mostrado no Capítulo 2, nas Figuras 2.8 e 2.9.

Os intermediários obtidos para a ozonização de 17α -etinilestradiol estão de acordo com o mecanismo apresentado por Huber *et al.* (2004). A concentração de ozônio aplicada não foi baixa. Portanto, o ozônio, além de ter reagido com o anel fenólico pode também ter reagido com o grupo etinil.

Essas duas substâncias tendem a ser estrogênicas, uma vez que apresentam o grupamento fenólico que é capaz de se ligar ao receptor de estrogênio e apresentar resposta estrogênica. Portanto, devem estar contribuindo para a atividade estrogênica residual das amostras de 17α -etinilestradiol e da mistura 17β -estradiol / 17α -etinilestradiol ozonizadas em pH 7 e 11. Entretanto, não foi possível verificar a estrogenicidade de Estra-1,3,5(10)-trien-17-one,2,3-bis[(trimetil)oxi] e de Estra-1,3,5(10)-trien-17-one,3,4-bis[(trimetil)oxi] pelo teste YES, uma vez que essas substâncias não são encontradas comercialmente.

5. CONCLUSÕES

Os processos de ozonização e O_3/H_2O_2 foram efetivos tanto na remoção dos estrogênios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol separadamente, quanto da mistura dessas substâncias. Em todos os valores de pH avaliados, baixas dosagens de ozônio (1 mg l^{-1}) foram capazes de remover mais de 96 % dos estrogênios. 17β -estradiol foi ligeiramente mais facilmente oxidado que 17α -etinilestradiol.

Houve um pequeno aumento na remoção dos estrogênios com o aumento da dosagem de ozônio, evidenciando a dificuldade de remoção desses poluentes em concentrações muito baixas, da ordem de $\mu\text{g l}^{-1}$ e ng l^{-1} . Ressalta-se que, são nessas concentrações que os chamados micropoluentes são encontrados no meio ambiente, causando efeitos adversos na saúde de humanos e animais.

Pelo teste YES, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol apresentaram potenciais estrogênicos bastantes próximos: o potencial estrogênico de 17β -estradiol foi apenas levemente superior ao potencial de 17α -etinilestradiol e a combinação dos estrogênios apresentou efeito aditivo na atividade estrogênica.

Os processos oxidativos foram capazes de reduzir a atividade estrogênica consideravelmente. Em pH 3, a estrogenicidade foi totalmente removida, mesmo com baixas dosagens de ozônio (1 mg l^{-1}), tanto para o processo de ozonização quanto para O_3/H_2O_2 . Entretanto, em pH 7 e 11 a atividade não foi completamente removida, mesmo com altas doses de ozônio. A atividade estrogênica remanescente nos pH 7 e 11 deve-se aos intermediários formados pela oxidação via radical OH. O processo de O_3/H_2O_2 em pH 7 levou à formação de subprodutos com um pouco mais de atividade estrogênica que o processo de ozonização devido a maior formação e atuação dos radicais OH. O ozônio molecular foi mais efetivo na remoção da atividade estrogênica do que os radicais OH.

A adição de peróxido de hidrogênio na razão molar O_3/H_2O_2 de 2:1 não resultou em uma maior remoção dos estrogênios e da atividade estrogênica.

A ozonização em pH ácido mostrou ser a técnica mais adequada na remoção da estrogenicidade. Os resultados obtidos são de extrema importância no que diz respeito aos processos de tratamento de água para abastecimento que utilizam ozônio, uma vez que, em geral, são realizados no pH original da água ($\sim 6,5$). As dosagens usualmente

aplicadas realmente podem levar a uma boa remoção dos estrogênios, mas não são suficientes para a remoção da atividade estrogênica, que é o efeito biológico indesejado.

Poucos foram os intermediários que puderam ser propostos. Somente foram identificados intermediários em pH 7 e 11; em pH 3 não. A explicação para a formação de diferentes subprodutos nos diversos valores de pH avaliados deve-se a diferentes mecanismos de reação entre os estrogênios e os oxidantes atuantes, uma vez que em pH ácido há atuação somente do ozônio molecular, em pH básico há atuação somente dos radicais OH enquanto que em pH neutro ambos oxidantes podem estar atuando.

Os intermediários propostos em pH 7 e 11 para a ozonização de 17β -estradiol foram 2-hidroxiestradiol e testosterona, com similaridades de 99 e 62,5 %, respectivamente, enquanto que para 17α -etinilestradiol foram Estra-1,3,5(10)-trien-17-one,2,3-bis[(trimetil)oxi] e Estra-1,3,5(10)-trien-17-one,3,4-bis[(trimetil)oxi], com similaridades de 90 e 70 %, respectivamente. Exceto a testosterona, os intermediários formados possuem um anel fenólico, provavelmente responsável pela atividade estrogênica e, portanto, contribuíram para a atividade estrogênica residual das amostras ozonizadas nesses valores de pH.

Foi verificado nesse trabalho que, apesar da alta remoção obtida para os estrogênios com os processos oxidativos, a atividade estrogênica não foi completamente removida em alguns casos. Portanto, verifica-se que é de fundamental importância a análise da atividade estrogênica por meio de ensaios *in vivo* ou *in vitro* juntamente com análises químicas, para avaliar os problemas causados pelas substâncias conhecidas como desreguladores endócrinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C., FILALI-MEKNASSI, Y., AURIOL, M. “Natural and Synthetic Hormones Degradation by Ozonation”, In: *IOA - 17th World Ozone Congress*, Strasbourg, 2005.
- ALMEIDA, E., ASSALIN, M. R., ROSA, M. A., DURAN, N. “Tratamento de Efluentes Industriais por Processos Oxidativos na Presença de Ozônio”, *Química Nova*, v. 27, n. 5, pp. 818-824, 2004.
- ALUM, A., YOON, Y., WESTERHOFF, P., ABBASZADEGAN, M. “Oxidation of Bisphenol A, 17 β -Estradiol, and 17 α -Ethinyl Estradiol and Byproduct Estrogenicity”, *Environmental Toxicology*, v. 19, pp. 257–264, 2004.
- ALVES, C., FLORES, L. C., CERQUEIRA, T. S., TORALLES, M. B. P. “Exposição Ambiental a Interferentes Endócrinos com Atividade Estrogênica e sua Associação com Distúrbios Puberais em Crianças”, *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, pp. 1005-1014, 2007.
- AHMED, S. A. “The Immune System as a Potential Target for Environmental Estrogens (Endocrine Disrupters): a New Emerging Field”, *Toxicology*, v. 150, pp. 191–206, 2000.
- ANDERSEN, H. R., ANDERSSON, A., ARNOLD, S. F., AUTRUP, H., BARFOED, M., BERESFORD, N. A., BJERREGAARD, P., CHRISTIANSEN, L. B., GISSEL, B., HUMMEL, R., JORGENSEN, E. B., KORSGAARD, B., GUEVEL, R. L., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J., MOLLER, A., NIELSEN, J. B., OLEA, N., OLES-KARASKO, A., PAKDEL, F., PEDERSEN, K. L., PEREZ, P., SKAKKEBCEK, N. E., SONNENSCHN, C., SOTO, A. M., SUMPTER, J. P., THORPE, S. M., GRANDJEAN, P. “Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals”, *Environmental Health Perspectives*, v. 107, pp. 89-108, 1999.
- ANDERSEN, H. R., HANSEN, M., KJOLHOLT, J., STUER-LAURIDSEN, F., TERNES, T., HALLING-SORENSEN, B. “Assessment of the Importance of Sorption for Steroid Estrogens Removal during Activated Sludge Treatment”, *Chemosphere*, v. 61, pp. 139–146, 2005.
- ANDERSEN, H., SIEGRIST, H., HALLING-SORENSEN, B., TERNES, T. “Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant”, *Environmental Science and Technology*, v. 37, n. 18, pp. 4021-4026, 2003.
- APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 2005.
- AQUINO NETO, F. R., *Cromatografia: Princípios Básicos e Técnicas Afins*, Interciência, Rio de Janeiro, 2003.
- ARNOLD, S. F., KLOTZ, D. M., COLLINS, B. M., VONIER, P. M., GUILLETTE, L. J., MCLACHLAN, J. A. “Synergistic Activation of Estrogen Receptor with Combinations of Environmental Chemicals”, *Science*, v. 272, pp. 1489-1492, 1996.

- ARNOLD, S. F., BERGERON, J. M., TRAN, D. Q., COLLINS, B. M., VONIER, P. M., CREWS, D., TOSCANO JR, W. A., MCLACHLAN, J. A. “Synergistic Responses of Steroidal Estrogens in Vitro (Yeast) and in Vivo (Turtles)”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 235, pp. 336–342, 1997.
- ARNOLD, S. F., VONIER, P. M., COLLINS, B. M., KLOTZ, D. M., GUILLETTE, JR., L. J., MCLACHLAN, J. A. “In Vitro Synergistic Interaction of Alligator and Human Estrogen Receptors with Combinations of Environmental Chemicals”, *Environmental Health Perspectives*, v. 105, Suppl. 3, pp. 615-618, 1997b.
- AZEVEDO, E. B., *Identificação e Toxicidade de Intermediários Formados na Degradação Fotocatalítica e na Ozonização de Fenol em Meio Salino*, Tese de Doutorado, UFRJ-COPPE, 2003.
- BAKER, V. A. “Endocrine Disrupters - Testing Strategies to Assess Human Hazard”, *Toxicology in Vitro*, v. 15, pp. 413–419, 2001.
- BALAKRISHNAN, P. A., ARUNAGIRI, A., RAO, P. G. “Ozone Generation by Silent Electric Discharge and its Application in Tertiary Treatment of Tannery Effluent”, *Journal of Electrostatics*, v. 56, pp. 77-86, 2002.
- BALCIOGLU, I. A., ÖTKER, M. “Treatment of Pharmaceutical Wastewater Containing Antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ Processes”, *Chemosphere*, v. 50, pp. 85-95, 2003.
- BARONTI, C., CURINI, R., D’ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A., SAMPERI, R. “Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water”, *Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 34, pp. 5059-5066, 2000.
- BECK, I. C., BRUHN, R., GANDRASS, J. “Analysis of Estrogenic Activity in Coastal Surface Waters of the Baltic Sea Using the Yeast Estrogen Screen”, *Chemosphere*, v. 63, pp. 1870–1878, 2006.
- BEHNISCH, P. A., FUJII, K., SHIOZAKI, K., KAWAKAMI, I., SAKAI, S. “Estrogenic and Dioxin – Like Potency in Each Step of a Controlled Landfill Leachate Treatment Plant in Japan”, *Chemosphere*, n. 43, pp. 977-984, 2001.
- BELFROID, A. C., VAN DER HORST, A., VETHAAK, A. D., SCHÄFER, A. J., RIJS, G. B. J., WEGENER, J., COFINO, W. P. “Analysis and Occurrence of Estrogenic Hormones and Their Glucuronides in Surface Water and Waste Water in The Netherlands”, *The Science of the Total Environment*, v. 225, pp. 101-108, 1999.
- BERESFORD, N., ROUTLEDGE, E. J., HARRIS, C. A., SUMPTER, J. P. “Issues Arising When Interpreting Results from an in Vitro Assay for Estrogenic Activity”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 162, pp. 22-33, 2000.

- BILA, D. M., *Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -Estradiol pelo Processo de Ozonização*, Tese de Doutorado, UFRJ/COPPE, 2005.
- BILA, D. M., DEZOTTI, M. “Fármacos no Meio Ambiente”, *Química Nova*, v. 26, n. 0, pp. 1-8, 2003.
- BILA, D. M., MONTALVÃO, A. F., AZEVEDO, D. A., DEZOTTI, M. “Estrogenic Activity Removal of 17 β -Estradiol by Ozonation and Identification of by-Products”, *Chemosphere*, v. 69, pp. 736-746, 2007.
- BIRKETT, J. W., LESTER, J. N., *Endocrine Disrupter in Wastewater and Sludge Treatment Process*, CRC Press LLC, Florida, 2003.
- BODZEK, M., DUDZIAK, M. “Elimination of Steroidal Sex Hormones by Conventional Water Treatment and Membrane Processes”, *Desalination*, v. 198, pp. 24-32, 2006.
- BOYD, G. R., REEMTSMA, H., GRIMM, D. A., MITRA, S. “Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Surface and Treated Waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada”, *The Science of the Total Environment*, v. 311, pp. 135-149, 2003.
- BRIAN, J. V., HARRIS, C. A., SCHOLZE, M., BACKHAUS, T., BOOY, P., LAMOREE, M., POJANA, G., JONKERS, N., RUNNALLS, T., BONFÀ, A., MARCOMINI, A., SUMPTER, J. P. “Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals”, *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 6, pp. 721-728, 2005.
- BROSSA, L., MARCÉ, R. M., BORRULL, F., POCURULL, E. “Application of on-line Solid-Phase Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry to the Determination of Endocrine Disruptors in Water Samples”, *Journal of Chromatography A*, v. 963, pp. 287-294, 2002.
- CAMEL, V., BERMOND, A. “The Use of Ozone and Associated Oxidation Processes in Drinking Water Treatment”, *Water Research*, v. 32, n. 11, pp. 3208-3222, 1998.
- CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J. M., LLOMPART, M., GARCÍA-JARES, C., RODRÍGUEZ, I., GOMÉZ, M., TERNES, T. “Behavior of Pharmaceuticals, Cosmetics and Hormones in a Sewage Treatment Plant”, *Water Research*, v. 38, pp. 2918-2926, 2004.
- CARGOUËT, M., PERDIZ, D., MOUATASSIM-SOUALI, A., TAMISIER-KAROLAK, S., LEVI, Y. “Assessment of River Contamination by Estrogenic Compounds in Paris Area (France)”, *Science of the Total Environment*, v. 324, pp. 55-66, 2004.
- CASTRO, C. M. B. “Perturbadores Endócrinos Ambientais: Uma Questão a Ser Discutida”, *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 7, n. 1,2, pp. 4-5, 2002.

- CATER, S. R., BIRCHER, K. G., STEVENS, R. D. S. "Rayox: a Second Generation Enhanced Oxidation Process for Groundwater Remediation", *In: Proceedings of a Symposium on Advanced Oxidation Process for the Treatment of Contaminated Water and Air*, Toronto, Canada, 1990.
- CHEN, P., ROSENFELDT, E. J., KULLMAN, S. W., HINTON, D. E., LINDEN, K. G. "Biological Assessments of a Mixture of Endocrine Disruptors at Environmentally Relevant Concentrations in Water Following UV/H₂O₂ Oxidation", *Science of the Total Environment*, v. 376, pp. 18–26, 2007.
- CLARA, M., KREUZINGER, N., STRENN, B., GANS, O., KROISS, H. "The Solids Retention Time – a Suitable Design Parameter to Evaluate the Capacity of Wastewater Treatment Plants to Remove Micropollutants", *Water Research*, v. 39, pp. 97–106, 2005.
- COLDHAM, N. G., DAVE, M., SIVAPATHASUNDARAM, S., MCDONNELL, D. P., CONNOR, C., SAUER, M. J. "Evaluation of a Recombinant Yeast Cell Estrogen Screening Assay", *Environmental Health Perspectives*, v. 105, n. 7, 1997.
- COLEMAN, H. M., ABDULLAH, M. I., EGGINS, B. R., PALMER, F. L. "Photocatalytic Degradation of 17 β -Oestradiol, Oestriol and 17 α -Ethinylloestradiol in Water Monitored Using Fluorescence Spectroscopy", *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 55, pp. 23-30, 2005.
- COLEMAN, H. M., EGGINS, B. R., BYRNE, J. A., PALMER, F. L., KING, E. "Photocatalytic Degradation of 17 β -Oestradiol on Immobilised TiO₂", *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 24, pp. L1-L5, 2000.
- COLEMAN, H. M., ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P., EGGINS, B. R., BYRNE, J. A. "Rapid Loss of Estrogenicity of Steroid Estrogens by UVA Photolysis and Photocatalysis over an Immobilised Titanium Dioxide Catalyst", *Water Research*, v. 38, pp. 3233-3240, 2004.
- CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS (CRC HANDBOOK) – edited by R.C.West, M.J. Astle, and W.H.Beyer. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1985.
- D'ASCENZO, G., DI CORCIA, A., 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, pp. 199–209, 2003.
- DASTON, G. P., GOOCH, J. W., BRESLIN, W. J., SHUEY, D. L., NIKIFOROV, A. I., FICO, T. A., GORSUCH, J. W. "Environmental Estrogens and Reproductive Health: a Discussion of the Human and Environmental Data", *Reproductive Toxicology*, v. 11, n. 4, pp. 465-481, 1997.
- DEBORDE, M., RABOUAN, S., DUGUET, J., LEGUBE, B. "Kinetics of Aqueous Ozone-Induced Oxidation of Some Endocrine Disruptors", *Environmental Science and Technology*, v. 39, pp. 6086-6092, 2005.

- DEBORDE, M., RABOUAN, S., GALLARD, H., LEGUBE, B. "Aqueous Chlorination Kinetics of Some Endocrine Disruptors", *Environmental Science and Technology*, v. 38, pp. 5577-5583, 2004.
- DESBROW, C., ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., SUMPTER, J. P., WALDOCK, M. "Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening", *Environmental Science and Technology*, v. 32, n. 11, pp. 1549-1558, 1998.
- DORABAWILA, N., GUPTA, G. "Endocrine Disrupter-Estradiol-in Chesapeake Bay Tributaries", *Journal of Hazardous Materials A*, v. 120, pp. 67-71, 2005.
- ESPERANZA, M., SUIDAN, M. T., MARFIL-VEJA, R., GONZALEZ, C., SORIAL, G. A., MCCAULEY, P., BRENNER, R. "Fate of Sex Hormones in Two Pilot-Scale Municipal Wastewater Treatment Plants: Conventional Treatment", *Chemosphere*, v. 66, pp. 1535-1544, 2007.
- ESPERANZA, M., SUIDAN, M. T., NISHIMURA, F., WANG, Z., SORIAL, G. A., ZAFFIRO, A., MCCAULEY, P., BRENNER, R., SAYLES, G. "Determination of Sex Hormones and Nonylphenol Ethoxylates in the Aqueous Matrixes of Two Pilot-Scale Municipal Wastewater Treatment Plants", *Environmental Science and Technology*, v. 38, n. 11, pp. 3028-3035, 2004.
- ESPLUGAS, S., GIMÉNEZ, J., CONTRERAS, S., PASCUAL, E., RODRÍGUEZ, M. "Comparison of Different Advanced Oxidation Processes for Phenol Degradation", *Water Research*, v. 36, pp. 1034-1042, 2002.
- EVANS, F. L., *Ozone in Water and Wastewater Treatment*, Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 1972.
- FENG, X., DING, S., TU, J., WU, F., DENG, N. "Degradation of Estrone in Aqueous Solution by Photo-Fenton System", *Science of the Total Environment*, v. 345, pp. 229-237, 2005a.
- FENG, X., TU, J., DING, S., WU, F., DENG, N. "Photodegradation of 17 β -Estradiol in Water by UV-vis/Fe(III)/H₂O₂ System", *Journal of Hazardous Materials B*, v. 127, pp. 129-133, 2005b.
- FENT, K., ESCHER, C., CAMINADA, D. "Estrogenic Activity of Pharmaceuticals and Pharmaceutical Mixtures in a Yeast Reporter Gene System", *Reproductive Toxicology*, v. 22, pp. 175-185, 2006.
- FOLMAR, L. C., DENSLOW, N. D., RAO, V., CHOW, M., CRAIN, D. A., ENBLUM, J., MARCINO, J., GUILLETTE JR, L. J. "Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentration in Feral Male Carp (*Cyprinus carpio*) Captured near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant", *Environmental Health Perspectives*, v. 104, n. 10, pp. 1096-1101, 1996.
- FOLMAR, L. C., HEMMER, M., HEMMER, R., BOWMAN, C., KROLL, K., DENSLOW, N. D. "Comparative Estrogenicity of Estradiol, Ethynyl Estradiol and Diethylstilbestrol in an In Vivo, Male Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*), Vitellogenin Bioassay", *Aquatic Toxicology*, v. 49, pp. 77-88, 2000.

- FOLMAR, L. C., HEMMER, M. J., DENSLOW, N. D., KROLL, K., CHEN, J., CHEEK, A., RICHMAN, H., MEREDITH, H., GRAU, E. G. "A Comparison of the Estrogenic Potencies of Estradiol, Ethynylestradiol, Diethylstilbestrol, Nonylphenol and Methoxychlor in Vivo and in Vitro", *Aquatic Toxicology*, v. 60, pp. 101-110, 2002.
- GAIDO, K. W., LEONARD, L. S., LOVELL, S., GOULD, J. C., BABAI, D., PORTIER, C. J., MCDONNELL, D. P. "Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay", *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 143, pp. 205-212, 1997.
- GASCON, J., OUBINA, A., BARCELO, D. "Detection of Endocrine Disrupting Pesticides by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): Application to Atrazine", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 16, pp. 554-562, 1997.
- GLAZE, W. H. "Drinking - Water Treatment with Ozone", *Environmental Science and Technology*, v. 21, n. 3, pp. 224-230, 1987.
- GOMES, R. L., AVCIOGLU, E., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. "Steroid Estrogen Determination in Sediment and Sewage Sludge: a Critique of Sample Preparation and Chromatographic/Mass Spectrometry Considerations, Incorporating a Case Study in Method Development", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 10-11, 2004.
- GOTTSCHALK, C., LIBRA, J. A., SAUPE, A., *Ozonation of Water and Waste Water – A Practical Guide for Understanding Ozone and its Application*, Wiley-Vch, 2002.
- GRAY JR, L. E. J., KELCE, W. R., WIESE, T., TYL, R., GAIDO, K., COOK, J., KLINEFELTER, G., DESAULNIERS, D., WILSON, E., ZACHAREWSKI, T., WALLER, C., FOSTER, P., LASKEY, J., REEL, J., GIESY, J., LAWS, S., MCLACHLAN, J., BRESLIN, W., COOPER, R., DI GIULIO, R., JOHNSON, R., PURDY, R., MIHAICH, E., SAFE, S., SONNENSCHNEIN, C., WELSHONS, W., MILLER, R., MCMASTER, S., COLBORN, T. "Endocrine Screening Methods Workshop Report: Detection of Estrogenic and Androgenic Hormonal and Antihormonal Activity for Chemicals That Act Via Receptor or Steroidogenic Enzyme Mechanisms", *Reproductive Toxicology*, v. 11, n. 5, pp. 719-750, 1997.
- GRAY JR, L. E. "Xenoendocrine Disrupters: Laboratory Studies on male Reproductive Effects", *Toxicology Letters*, v. 102-103, pp. 331-335, 1998.
- GUTENDORF, B., WESTENDORF, J. "Comparison of an Array of In Vitro Assays for the Assessment of the Estrogenic Potential of Natural and Synthetic Estrogens, Phytoestrogens and Xenoestrogens", *Toxicology*, v. 166, pp. 79-89, 2001.
- HAMBLIN, E. L., CRONIN, M. T. D., SCHULTZ, T. W. "Estrogenicity and Acute Toxicity of Selected Anilines Using a Recombinant Yeast Assay", *Chemosphere*, v. 52, pp. 1173-1181, 2003.

- HANSEN, P. -D., DIZER, H., HOCK, B., MARX, A., SHERRY, J., MCMASTER, M. BLAISE, C. "Vitellogenin - a Biomarker for Endocrine Disruptors", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 17, n. 7, pp. 448–451, 1998.
- HARRIES, J. E., SHEANAN, D. A., JOBLING, S., MATTHIESSEN, P., NEALL, P., SUMPTER, J. P., TYLOR, T., ZAMAN, N. "Estrogenic Activity in Five United Kingdom Rivers Detected by Measurement of Vitellogenesis in Caged Male Trout", *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16, pp. 534–542, 1997.
- HARRISON, J. F., *Ozone for Point-of Use, Point-of Entry, and Small Water System Water Treatment Applications – A Reference Manual*, The Water Quality Association, USA, 2000.
- HARRISON, P. T. C., HOLMES, P., HUMFREY, C. D. N. "Reproductive Health in Humans and Wildlife: Are Adverse Trends Associated With Environmental Chemical Exposure?", *The Science of the Total Environment*, v. 205, pp. 97-106, 1997.
- HASHIMOTO, T., ONDA, K., NAKAMURA, Y., TADA, K., MIYA, A., MURAKAMI, T. "Comparison of Natural Estrogen Removal Efficiency in the Conventional Activated Sludge Process and the Oxidation Ditch Process", *Water Research*, v. 41, pp. 2117–2126, 2007.
- HEBERER, T. "Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: a Review of Recent Research Data", *Toxicology Letters*, v. 131, pp. 5–17, 2002.
- HERNANDO, M. D., MEZCUA, M., GÓMEZ, M. J., MALATO, O., AGÜERA, A., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. "Comparative Study of Analytical Methods Involving Gas Chromatography-Mass Spectrometry After Derivatization and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Selected Endocrine Disrupting Compounds in Wastewater", *Journal of Chromatography A*, v. 1047, pp. 129-135, 2004.
- 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*, v. 333, pp. 185-193, 2004.
- HOIGNÉ, J., BADER, H. "Rate Constants of Reactions of Ozone With Organic and Inorganic Compounds in Water - I Non-Dissociating Organic Compounds", *Water Research*, v. 17, pp. 173-183, 1983.
- HOIGNÉ, J., BADER, H. "The Role of Hydroxyl Radical Reactions in Ozonation Processes in Aqueous Solutions", *Water Research*, v.10, pp. 377-386, 1976.
- HUANG, C. R., SHU, H. Y. "The Reaction Kinetics, Decomposition Pathways and Intermediate Formations of Phenol in Ozonation, UV/O₃ and UV/H₂O₂ Processes", *Journal of Hazardous Materials*, v. 41, pp. 47-64, 1995.

- HUANG, C. P., DONG, C., TANG, Z. “Advanced Chemical Oxidation: Its Present Role and Potential Future in Hazardous Waste Treatment”, *Waste Management*, v. 13, n. 5-7, pp. 361-377, 1993.
- HUBER, M. M., CANONICA, S., PARK, G. Y., VON GUNTEN, U. “Oxidation of Pharmaceuticals During Ozonation and Advanced Oxidation Processes”, *Environment Science and Technology*, v. 37, pp. 1016-1024, 2003.
- HUBER, M. M., KORHONEN, S., TERNES, T. A., VON GUNTEN, U. “Oxidation of Pharmaceuticals during Water Treatment with Chlorine Dioxide”, *Water Research*, v. 39, pp. 3607–3617, 2005.
- HUBER, M. M., TERNES, T. A., VON GUNTEN, U. “Removal of Estrogenic Activity and Formation of Oxidation Products during Ozonation of 17 α -Ethinylestradiol”, *Environment Science and Technology*, v. 38, pp. 5177-5186, 2004.
- HU, J., CHENG, S., AIZAWA, T., TERAQ, Y., KUNIKANE, S. “Products of Aqueous Chlorination of 17 β -Estradiol and Their Estrogenic Activities”, *Environment Science and Technology*, v. 37, n. 24, pp. 5665-5670, 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, pp. 54-62, 2005.
- ISOBE, T., SHIRAIISHI, H., YASUDA, M., SHINODA, A., SUZUKI, H., MORITA, M. “Determination of Estrogens and their Conjugates in Water using Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 984, pp. 195–202, 2003.
- JEANNOT, R., SABIK, H., SAUVARD, E., DAGNAC, T., DOHRENDORF, K. “Determination of Endocrine-Disrupting Compounds in Environmental Samples using Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 974, pp. 143–159, 2002.
- JIANG, J. Q., YIN, Q., ZHOU, Z. L., PEARCE, P. “Occurrence and Treatment Trials of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) in Wastewaters”, *Chemosphere*, v. 61, pp. 544–550, 2005.
- JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHTY, G., SUMPTER, J. P. “Widespread Sexual Disruption in Wild Fish”, *Environmental Science Technology*, v. 32, pp. 2498-2506, 1998.
- JOHNSON, A. C., AERNI, H. R., GERRITSEN, A., GIBERT, M., GIGER, W., HYLLAND, K., JÜRGENS, 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. 39, pp. 47-58, 2005.
- JOHNSON, A. C., BELFROID, A., DI CORCIA, A. “Estimating Steroid Oestrogen Inputs into Activated Sludge Treatment Works and Observations on their

- Removal from the Effluent”, *The Science of the Total Environment*, v. 256, pp. 163-173, 2000.
- JOHNSON, A. C., SUMPTER, J. P. “Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works”, *Environmental Science and Technology*, v. 35, n. 24, pp. 4697-4703, 2001.
- JOHNSON, A. C., WILLIAMS, R. J., SIMPSON, P., KANDA, R. “What Difference Might Sewage Treatment Performance Make to Endocrine Disruption in Rivers?”, *Environmental Pollution*, v. 147, pp. 194-202, 2007.
- JOSS, A., ANDERSEN, H., TERNES, T., RICHLER, P. R., SIEGRIST, H. “Removal of Estrogens in Municipal Wastewater Treatment under Aerobic and Anaerobic Conditions: Consequences for Plant Optimization”, *Environmental Science and Technology*, v. 38, n. 11, pp. 3047-3055, 2004.
- JÜRGENS, 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*, v. 21, n. 3, pp. 480-488, 2002.
- KELLY, C. “Analysis of Steroids in Environmental Water Samples Using Solid Phase Extraction and Ion Trap Gas Chromatography - Mass Spectrometry and Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 872, pp. 309–314, 2000.
- 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, pp. 1013–1021, 2007.
- KIMURA, K., TOSHIMA, S., AMY, G., WATANABE, Y. “Rejection of Neutral Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) and Pharmaceutical Active Compounds (PhACs) by RO Membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 245, n. 1-2, pp. 71–78, 2004.
- KIM, S. E., YAMADA, H., TSUNO, H. “Evaluation of Estrogenicity for 17 β -Estradiol Decomposition during Ozonation”, *Ozone Science and Engineering*, v. 26, n. 6, pp. 563-571, 2004.
- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B., BUXTON, H. T. “Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance”, *Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 6, pp. 1202-1211, 2002.
- KORACH, K. S., MCLACHLAN, J. A. “Techniques for Detection of Estrogenicity”, *Environment Health Perspectives*, v. 103, suppl. 7, n. 5-8, 1995.
- KÖRNER, W., BOLZ, U., SUßMUTH, W., HILLER, G., SCHULLER, W., HANF, V., HAGENMAIER, H. “Input/Output Balance of Estrogenic Active Compounds in

- a Major Municipal Sewage Plant in Germany”, *Chemosphere*, v. 40, pp. 1131-1142, 2000.
- KÖRNER, W., HANF, V., SCHULLER, W., BARTSCH, H., ZWIRNER, M., HAGENMAIER, H. “Validation and Application of a Rapid *in Vitro* Assay for Assessing the Estrogenic Potency of Halogenated Phenolic Chemicals”, *Chemosphere*, v. 37, pp. 2395-2407, 1998.
- KÖRNER, W., HANF, V., SCHULLER, W., KEMPTER, C., METZGER, J., HAGENMAIER, H. “Development of a Sensitive E-screen Assay for Quantitative Analysis of Estrogenic Activity in Municipal Sewage Plant Effluents”, *The Science of the Total Environment*, v. 225, pp. 33-48, 1999.
- KORTENKAMP, A., ALTENBURGER, R. “Synergisms with Mixtures of Xenoestrogens: A Reevaluation Using the Method of Isoboles”, *The Science of the Total Environment*, v. 221, pp. 59-73, 1998.
- 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”, *Environmental Science and Technology*, v. 35, n. 15, pp. 3201-3206, 2001.
- KUSTER, M., DE ALDA, M. J. L., BARCELÓ, D. “Analysis and Distribution of Estrogens and Progestogens in Sewage Sludge, Soils and Sediments”, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 10-11, 2004.
- 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, pp. 79–88, 2004.
- LAGANÀ, A., BACALONI, A., FAGO, G., MARINO, A. “Trace Analysis of Estrogenic Chemicals in Sewage Effluent using Liquid Chromatography Combined with Tandem Mass Spectrometry”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 14, n. 6, pp. 401–407, 2000.
- LAI, K. M., JOHNSON, K. L., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. “Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems”, *Environment Science Technology*, v. 34, pp. 3890-3894, 2000.
- LAI, K. M., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. “The Effects of Natural and Synthetic Steroid Estrogens in Relation to their Environmental Occurrence”, *Critical Reviews in Toxicology*, v. 32, n. 2, pp. 113-132, 2002.
- LARSSON, D. G. J., ADOLFSSON-ERICI, M., PARKKONEN, J., PETTERSSON, M., BERG, A. H., OLSSON, P. -E., FÖRLIN, L. “Ethinylloestradiol - an Undesired Fish Contraceptive?”, *Aquatic Toxicology*, v. 45, pp. 91–97, 1999.
- LEE, H. B., PEART, T. E., SVOBODA, M. L. “Determination of Endocrine-Disrupting Phenols, Acidic Pharmaceuticals, and Personal-Care Products in Sewage by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography - Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 1094, pp. 122–129, 2005.

- LEGRINI, O., OLIVEROS, E., BRAUN, M. "Photochemical Processes for Water Treatment", *Chemical Reviews*, v. 93, p. 671-698, 1993.
- LIU, B., LIU, X. "Direct Photolysis of Estrogens in Aqueous Solutions", *Science of the Total Environment*, v. 320, pp. 269-274, 2004.
- LIU, B., WU, F., DENG, N. S. "UV-Light Induced Photodegradation of 17 α -Ethinylestradiol in Aqueous Solutions", *Journal of Hazardous Materials B*, v. 98, pp. 311-316, 2003.
- LIU, J., CARR, S., RINALDI, K., CHANDLER, W. "Screening Estrogenic Oxidized By-Products by Combining ER Binding and Ultrafiltration", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, pp. 269-278, 2005.
- LÓPEZ, A., BENBELKACEM, H., PIC, J. S., DEBELLEFONTAINE, H. "Influence of T-Butanol and of pH on Hydrodynamic and Mass Transfer Parameters in an Ozone Bubble Column", In: *IOA International Conference in Barcelona*, 2004.
- LÓPEZ DE ALDA, M. J., 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, pp. 203-210, 2001.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., PIC, J. -S., BENBELKACEM, H., DEBELLEFONTAINE, H. "Influence of t-Butanol and of pH on Hydrodynamic and Mass Transfer Parameters in an Ozonation Process", *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, pp. 649-655, 2007.
- MAGARA, Y., ITOH, M., MORIOKA, T. "Application of Ozone to Water Treatment and Power Consumption of Ozone Generating Systems", *Progress in Nuclear Energy*, v. 29, pp. 175-182, 1995.
- MA, J., GRAHAM, N. J. D. "Degradation of Atrazine by Manganese - Catalysed Ozonation - Influence of Radical Scavengers", *Water Research*, v. 34, n. 15, pp. 3822-3828, 2000.
- MATSUMOTO, T., KOBAYASHI, M., MORIWAKI, T., KAWAI, S., WATABE, S. "Survey of Estrogenic Activity in Fish Feed by Yeast Estrogen-Screen Assay", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 139, pp. 147-152, 2004.
- MAYES, S. E., RUISINGER, T. "Using Ozone For Water Treatment", *ASHRAE Journal*, v. 40, n. 5, pp. 39-42, 1998.
- MEYER, A., SARCINELLI, P. N., MOREIRA, J. C. "Estarão Alguns Grupos Populacionais Brasileiros Sujeitos à Ação de Disruptores Endócrinos?", *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, pp. 845-850, 1999.
- MUNTER, R. "Advanced Oxidation Processes – Current Status and Prospects", *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, v. 50, n. 2, pp. 59-80, 2001.

- MVULA, E., SCHUCHMANN, M. N., VON SONNTAG, C. “Reactions of Phenol – OH - Adduct Radicals. Phenoxy Radical Formation by Water Elimination vs. Oxidation by Dioxygen”, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, pp. 264–268, 2001.
- MVULA, E., VON SONNTAG, C. “Ozonolysis of Phenols in Aqueous Solution”, *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 1, pp. 1749-1756, 2003.
- NAKADA, N., SHINOHARA, H., MURATA, A., KIRI, K., MANAGAKI, S., SATO, N., TAKADA, H. “Removal of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) and Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) during Sand Filtration and Ozonation at a Municipal Sewage Treatment Plant”, *Water Research*, v. 41, pp. 4373–4382, 2007.
- NAKADA, N., TANISHIMA, T., SHINOHARA, H., KIRI, K., TAKADA, H. “Pharmaceutical Chemicals and Endocrine Disrupters in Municipal Wastewater in Tokyo and their Removal during Activated Sludge Treatment”, *Water Research*, v. 40, pp. 3297–3303, 2006.
- NAKAMURA, S., SIAN, T. H., DAISHIMA, S. “Determination of Estrogens in River Water by Gas Chromatography – Negative - Ion Chemical - Ionization Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 919, pp. 275–282, 2001.
- NASH, J. P., KIME, D. E., VAN DER VEN, L. T. M., WESTER, P. W., BRION, F., MAACK, G., STAHLSCHEMIDT-ALLNER, P., TYLER, C. R. “Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish”, *Environmental Health Perspectives*, v. 112, n. 17, 2004.
- NELSON, J., BISHAY, F., VAN ROODSELAAR, A., IKONOMOU, M., LAW, F. C. P. “The Use of *In Vitro* Bioassays to Quantify Endocrine Disrupting Chemicals in Municipal Wastewater Treatment Plant Effluents”, *Science of the Total Environment*, v. 374, pp. 80–90, 2007.
- NGHIEM, L. D., MANIS, A., SOLDENHOFF, K., SCHÄFER, A. I. “Estrogenic Hormone Removal from Wastewater Using NF/RO Membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 242, pp. 37-45, 2004.
- NOGUEIRA, J. M. F. “Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitoração dos Sistemas Aquáticos”, *Química*, v. 88, pp. 65-71, 2003.
- ODUM, J., LEFEVRE, P. A., TITTENSOR, S., PATON, D., ROUTLEDGE, E. J., BERESFORD, N. A., SUMPTER, J. P., ASHBY, J. “The Rodent Uterotrophic Assay: Critical Protocol Features, Studies with Nonyl Phenols, and Comparison with a Yeast Estrogenicity Assay”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 25, pp. 176–188, 1997.
- OH, S., CHOUNG, S., SHEEN, Y., CHUNG, K. “Quantitative Assessment of Estrogenic Activity in the Water Environment of Korea by the E-SCREEN Assay”, *The Science of the Total Environment*, v. 263, pp. 161-169, 2000.

- OH, S., PARK, K., CHUNG, K. "Combination of In Vitro Bioassays Encompassing Different Mechanisms to Determine the Endocrine-Disrupting Effects of River Water", *Science of the Total Environment*, v. 354, pp. 252–264, 2006.
- OHKO, Y., IUCHI, K., NIWA, C., TATSUM A, T., NAKASHIMA, T., IGUCHI, T., KUBOTA, Y., FUJISHIMA, A. "17 β -Estradiol Degradation by TiO₂ Photocatalysis as a Means of Reducing Estrogenic Activity", *Environmental Science and Technology*, v. 36, pp. 4175-4181, 2002.
- OLEA, N., FERNÁNDEZ, M. F., ARAQUE, P., OLEA-SERRANO, F. "Perspectivas en Disrupción Endocrina", *Gaceta Sanitaria*, v. 16, n. 3, 2002.
- PAILLARD, H., BRUNET, R., DORE, M. "Optimal Conditions for Applying an Ozone-Hydrogen Peroxide Oxidizing System", *Water Research*, v. 22, n. 1, pp. 91-103, 1988.
- PAIT, A. S., NELSON, J. O. "Vitellogenesis in Male *Fundulus heteroclitus* (Killifish) Induced by Selected Estrogenic Compounds", *Aquatic Toxicology*, v. 64, pp. 331–342, 2003.
- PAWLOWSKI, S., TERNES, T. A., BONERZ, M., RASTALL, A. C., ERDINGER, L., BRAUNBECK, T. "Estrogenicity of Solid Phase-Extracted Water Samples from two Municipal Sewage Treatment Plant Effluents and River Rhine Water using the Yeast Estrogen Screen", *Toxicology in Vitro*, n. 18, pp. 129–138, 2004.
- PARASKEVA, P. "Ozonation of Municipal Wastewater Effluent", *Water Environment Research*, v. 74, n. 6, pp. 569-581, 2002.
- PAYNE, J. P., RAJAPAKSE, N. A., WILKINS, M., KORTENKAMP, A. "Prediction and Assessment of the Effects of Mixtures of Four Xenoestrogens", *Environmental Health Perspectives*, v. 108, pp. 983-987, 2000.
- PEZZELLA, A., MANINI, P., DI DONATO, P., BONI, R., NAPOLITANO, A., PALUMBOB, A., D'ISCHIAA, M. "17 β -Estradiol Nitration by Peroxidase / H₂O₂ / NO₂: a Chemical Assessment", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 12, pp. 2927–2936, 2004.
- PURDOM, C. E., HARDIMAN, P. A., BYE, V. J., ENO, N. C., TYLER, C. R., SUMPTER, J. P. "Oestrogenic Effects of Effluent from Sewage Treatment Works", *Chemistry and Ecology*, v. 8, pp. 75–85, 1994.
- RAJAPAKSE, N., ONG, D., KORTENKAMP, A. "Defining the Impact of Weakly Estrogenic Chemicals on the Action of Steroidal Estrogens", *Toxicological Sciences*, v. 60, pp. 296-304, 2001.
- REIS FILHO, R. W., DE ARAÚJO, J. C., VIEIRA, E. M. "Hormônios Sexuais Estrógenos: Contaminantes Bioativos", *Química Nova*, v. 29, n. 4, pp. 817-822, 2006.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S., LÓPEZ DE ALDA, M. J., BARCELÓ, D. "Monitoring of Estrogens, Pesticides and Bisphenol A in Natural Waters and Drinking Water

- Treatment Plants by Solid-Phase Extraction – Liquid Chromatography – Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 1045, pp. 85–92, 2004.
- ROSE, J., HOLBECH, H., LINDHOLST, C., NØRUM, U., POVLSEN, A., KORSGAARD, B., BJERREGAARD, P. “Vitellogenin Induction by 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinylestradiol in Male Zebrafish (*Danio rerio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 131, pp. 531–539, 2002.
- ROSENFELDT, E. J., CHEN, P. J., KULLMAN, S., LINDEN, K. G. “Destruction of Estrogenic Activity in Water using UV Advanced Oxidation”, *Science of the Total Environment*, v. 377, pp. 105–113, 2007.
- ROSENFELDT, E. J., LINDEN, K. G. “Degradation of Endocrine Disrupting Chemicals Bisphenol A, Ethinyl Estradiol, and Estradiol During UV Photolysis and Advanced Oxidation Processes”, *Environmental Science and Technology*, v. 38, pp. 5476-5483, 2004.
- ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAN, D., DESBROW, C., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M., SUMPTER, J. P. “Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach”, *Environmental Science and Technology*, v. 32, pp. 1559-1565, 1998.
- ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. “Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, pp. 241-248, 1996.
- RUDDER, J., VAN DE WIELE, T., DHOOGHE, W., COMHAIRE, F., VERSTRAETE, W. “Advanced Water Treatment with Manganese Oxide for the Removal of 17 α -Ethinylestradiol (EE2)”, *Water Research*, v. 38, pp. 184-192, 2004.
- SALSTE, L., LESKINEN, P., VIRTA, M., KRONBERG, L. “Determination of Estrogens and Estrogenic Activity in Wastewater Effluent by Chemical Analysis and the Bioluminescent Yeast Assay”, *Science of the Total Environment*, v. 378, pp. 343–351, 2007.
- SERVOS, M. R., BENNIE, D. T., BURNISON, B. K., JURKOVICB, A., MCINNISB, R., NEHELIB, T., SCHNELLC, A., SETOB, P., SMYTHB, S. A., TERNESD, T. A. “Distribution of Estrogens, 17 β -Estradiol and Estrone, in Canadian Municipal Wastewater Treatment Plants”, *Science of the Total Environment*, v. 336, pp. 155-170, 2005.
- SHELBY, M. D., NEWBOLD, R. R., TULLY, D. B., CHAE, K., DAVIS, V. L. “Assessing Environmental Chemicals for Estrogenicity Using a Combination of In Vitro and In Vivo Assays”, *Environmental Health Perspectives*, v. 104, n. 12, pp. 1296–1300, 1996.
- SILVA, E., RAJAPAKSE, N., KORTENKAMP, A. “Something from “Nothing” – Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects”, *Environmental Science and Technology*, v. 36, pp. 1751-1756, 2002.

- SNYDER, S. A., WESTERHOFF, P., YOON, Y., SEDLAK, D. “Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry”, *Environmental Engineering Science*, v. 20, n. 5, pp. 449–469, 2003.
- SNYDER, S., KEITH, T. L., VERBRUGGE, D. A., SNYDER, E. M., GROSS, T. S., KANNAN, K., GIESY, J. P. “Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures”, *Environmental Science and Technology*, v. 33, n. 16, pp. 2814-2820, 1999.
- SOLOMON, G., SCHETTLER, T. “Environment and Health: 6. Endocrine Disruption and Potential Human Health Implications”, *Canadian Medical Association Journal*, v. 163, n. 11, pp. 1471-1476, 2000.
- SOTO, A. M., SONNENSCHNEIN, C., CHUNG, K. L., FERNANDEZ, M. F., OLEA, N., SERRANO, F. O. “The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants”, *Environmental Health Perspectives*, v. 103, Suppl 7, pp. 113-122, 1995.
- STAEHELIN, J., HOIGNÉ, J. “Decomposition of Ozone in Water: Rate of Initiation by Hydroxide Ion and Hydrogen Peroxide”, *Environmental Science and Technology*, v. 16, pp. 676-81, 1982.
- STUMPF, M., TERNES, T. A., WILKEN, R. D., RODRIGUES, S. V., BAUMANN, V. “Polar Drug Residues in Sewage and Natural Waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil”, *The Science of the Total Environment*, v. 225, pp. 135-141, 1999.
- SUMPTER, J. P., JOBLING, S. “Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment”, *Environmental Health Perspectives*, v. 103, Suppl 7, pp.173-178, 1995.
- SUMPTER, J. P. “Xenoendocrine Disrupters – Environmental Impacts”, *Toxicology Letters*, v. 102-103, pp. 337-342, 1998.
- SUN, Q., DENG, S., HUANG, J., SHEN, G., YU, G. “Contributors to Estrogenic Activity in Wastewater from a Large Wastewater Treatment Plant in Beijing, China”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 25, pp. 20–26, 2008.
- SVENSON, A., ALLARD, A., EK, M. “Removal of Estrogenicity in Swedish Municipal Sewage Treatment Plants”, *Water Research*, v. 37, pp. 4433–4443, 2003.
- TANAKA, H., YAKOU, Y., TAKAHASHI, A., HIGASHITANI, T., KOMORI, K. “Comparison between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast Assay and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment”, *Water Science and Technology*, v. 43, n. 2, pp. 125–132, 2001.
- TAN, B. L. L., HAWKER, D. W., MÜLLER, J. F., LEUSCH, F. D. L., TREMBLAY, L. A., CHAPMAN, H. F. “Comprehensive Study of Endocrine Disrupting Compounds using Grab and Passive Sampling at Selected Wastewater

- Treatment Plants in South East Queensland, Australia”, *Environment International*, v. 33, pp. 654–669, 2007.
- TAPIERO, H., NGUYEN BA, G., TEW, K. D. “Estrogens and Environmental Estrogens”, *Biomed Pharmacother*, v. 56, pp. 36-44, 2002.
- TERNES, T. A., ANDERSEN, H., GILBERG, D., BONERZ, M. “Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS”, *Analytical Chemistry*, v. 74, pp. 3498-3504, 2002.
- 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, pp. 91-99, 1999a.
- TERNES, T. A., STÜBER, J., HERMANN, N., MCDOWELL, D., RIED, A., KAMPMANN, M., TEISER, B. “Ozonation: a Tool for Removal of Pharmaceuticals, Contrast Media and Musk Fragrances from Wastewater?”, *Water Research*, v. 37, pp. 1976-1982, 2003.
- TERNES, T. A., STUMPH, 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, pp. 81-90, 1999b.
- THORPE, K. L., CUMMINGS, R. I., HUTCHINSON, T. H., SCHOLZE, M., BRIGHTY, G., SUMPTER, J. P., TYLER, C. R. “Relative Potencies and Combination Effects of Steroidal Estrogens in Fish”, *Environmental Science and Technology*, v. 37, n. 6, pp. 1142-1149, 2003.
- THORPE, K. L., HUTCHINSON, T. H., HETHERIDGE, M. J., SCHOLZE, M., SUMPTER, J. P., TYLER, C. R. “Assessing the Biological Potency of Binary Mixtures of Environmental Estrogens using Vitellogenin Induction in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Environmental Science and Technology*, v. 35, pp. 2476–2481, 2001.
- TYLER, C. R., JOBLING, S., SUMPTER, J. P. “Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence”, *Critical Reviews in Toxicology*, v. 28, n. 4, pp. 319–361, 1998.
- URASE, T., KIKUTA, T. “Separate Estimation of Adsorption and Degradation of Pharmaceutical Substances and Estrogens in the Activated Sludge Process”, *Water Research*, v. 39, pp. 1289–1300, 2005.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: an Effects Assessment and Analysis*, n. EPA/630/R-96/012, Washington D. C., 1997.
- VADER, J. S., VAN GINKEL, C. G., SPERLING, F. M. G. M., DE JONG, J., DE BOER, W., DE GRAAF, J. S., VAN DER MOST, M., STOKMAN, P. G. W. “Degradation of Ethinyl Estradiol by Nitrifying Activated Sludge”, *Chemosphere*, v. 41, pp. 1239-1243, 2000.

- VAN DEN BELT, K., BERCKMANS, P., VANGENECHTEN, C., VERHEYEN, R., WITTERS, H. "Comparative Study on the In Vitro/In Vivo Estrogenic Potencies of 17 β -Estradiol, Estrone, 17 α -Ethinylestradiol and Nonylphenol", *Aquatic Toxicology*, v. 66, pp. 183–195, 2004.
- VAN DEN BELT, K., VERHEYEN, R., WITTERS, H. "Comparison of Vitellogenin Responses in Zebrafish and Rainbow Trout Following Exposure to Environmental Estrogens", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, pp. 271–281, 2003.
- VON GUNTEN, U. "Ozonation of Drinking Water: Part I. Oxidation Kinetics and Product Formation", *Water Research*, v. 37, pp. 1443-1467, 2003.
- WANG, S., HUANG, W., FANG, G., ZHANG, Y., QIAO, H. "Analysis of Steroidal Estrogen Residues in Food and Environmental Samples", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 88, n. 1, pp. 1-25, 2008.
- WARING, R. H., HARRIS, R. M. "Endocrine disruptors: A human risk?", *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 244, pp. 2–9, 2005.
- WESTERHOFF, P., YOON, Y., SHYDER, S., WERT, E. "Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes", *Environmental Science and Technology*, v. 39, pp. 6649–6663, 2005.
- WITORSCH, R. J. "Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted?", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 36, pp. 118–130, 2002.
- 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. 932, pp. 195-204, 2001.
- YAPING, Z., JIANGYONG, H. "Photo-Fenton Degradation of 17 β -estradiol in Presence of α -FeOOHR and H₂O₂", *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 78, pp. 250–258, 2008.
- YING, G. G., KOOKANA, R. S., RU, Y. J. "Occurrence and Fate of Hormones Steroids in the Environment", *Environment International*, v. 28, pp. 545-551, 2002.
- YOON, Y., WESTERHOFF, P., YOON, J., SNYDER, S. A. "Removal of 17 β -Estradiol and Fluoranthene by Nanofiltration and Ultrafiltration", *Journal of Environmental Engineering*, v. 130, n. 12, pp. 1460–1467, 2004.
- ZACHAREWSKI, T. "In Vitro Bioassays for Assessing Estrogenic Substances", *Environmental Science and Technology*, v. 31, n. 3, 1997.
- ZHANG, Y., ZHOU, Z. L., NING, B. "Photodegradation of Estrone and 17 β -Estradiol in Water", *Water Research*, v. 41, pp. 19–26, 2007.

- ZHANG, Y., ZHOU, J. L. "Removal of Estrone and 17 β -Estradiol from Water by Adsorption", *Water Research*, v. 39, pp. 3991–4003, 2005.
- ZUO, Y., ZHANG, K., DENG, Y. "Occurrence and Photochemical Degradation of 17 α -Ethinylestradiol in Acushnet River Estuary", *Chemosphere*, v. 63, pp. 1583–1590, 2006.
- ZWIENER, C., FRIMMEL, F. H. "Oxidative Treatment of Pharmaceuticals in Water", *Water Research*, v. 34, n. 6, pp. 1881-1885, 2000.