

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**TAISE PERONDI**

**PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS NA DEGRADAÇÃO DE HORMÔNIOS  
SEXUAIS FEMININOS: CINÉTICA, PRODUTOS E TOXICIDADE**

**FRANCISCO BELTRÃO – PR**

**2019**

**TAISE PERONDI**

**PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS NA DEGRADAÇÃO DE HORMÔNIOS  
SEXUAIS FEMININOS: CINÉTICA, PRODUTOS E TOXICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.  
Área de Concentração: Tecnologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr.<sup>a</sup> Ticiane Sauer Pokrywiecki  
Coorientador: Prof. Dr.<sup>a</sup> Elisângela Dusman

**FRANCISCO BELTRÃO – PR**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR – Câmpus Francisco Beltrão

P453p Perondi, Taise

Processos oxidativos avançados na degradação de hormônios sexuais femininos: cinética, produtos e toxicidade / Taise Perondi. – Francisco Beltrão: [s.n.], 2019. 126 f. il.

Orientador: Prof Dr<sup>a</sup>. Ticiane Sauer Pokrywiecki.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela Dusman.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Francisco Beltrão, 2019.

Bibliografia: f. 58-69

1. Bacias hidrográficas. 2. Água - Poluição. 3. Hormônios sexuais. 4. Estrógenos. 5. Cromatografia a líquido. I. Pokrywiecki, Ticiane Sauer, orient. II. Dusman, Elisângela, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Ambiental. V. Título.

CDD: 628

FOLHA DE APROVAÇÃO Nº 003

PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS NA DEGRADAÇÃO DE HORMÔNIOS SEXUAIS  
FEMININOS: CINÉTICA, PRODUTOS E TOXICIDADE

por

Taise Perondi

Esta dissertação foi apresentada às nove horas do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e dezenove como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL, com área de concentração em Meio Ambiente, linha de pesquisa em Tecnologia Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana Cristina Biral Leme -  
UNIOESTE  
*Membro externo*

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ticiane Sauer Pokrywiecki – UTFPR  
*Orientadora*

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisete Guimarães – UTFPR  
*Membro*

---

Prof. Dr. Rodrigo Lingnau – UTFPR  
*Coordenador*

**A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NA COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL: ANÁLISE E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tem na vida, a mais alta ou mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”. (Ayrton Senna).

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ticiane Sauer Pokrywiecki pela confiança, amizade, ensinamentos e, principalmente, por ter acreditado em meu potencial.

À minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisangela Dusman, pelos ensinamentos e confiança.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosely Aparecida Peralta, pelo exemplo de profissionais, pelos ensinamentos e pela confiança.

Aos meus pais e a minha irmã por todo apoio e amor.

A todos os meus amigos, em especial a Maíra, Joseane, Guilherme e Thaís.

Aos meus colegas de mestrado, em especial a Ana, Chayanne e Vitória, pela amizade.

Ao Laboratório de Engenharia e Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelas análises de CG-MS.

Aos meus amigos e colegas do LEMA: Alex, Ana, Camila, Gidiane, Daniela, Ricardo, Jaizia, Jean, Júnior e Rosângela.

Ao Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas (CEBIME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelas análises de HPLC-MS. Em especial, agradeço a técnica Ellis por todo auxílio prestado.

A Prefeitura de Marmeleiro pelo auxílio financeiro para a elaboração desta pesquisa. Em especial à Marilete por todo auxílio prestado.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela oportunidade.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

## RESUMO

Os hormônios naturais, como estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), e sintético, 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), estão sendo frequentemente detectados em águas residuais e em águas superficiais, causando preocupação devido a sua toxicidade à vida aquática em níveis extremamente baixos. Mais especificamente, estas substâncias classificadas como Desruptores Endócrinos causam efeitos alarmantes, como: feminização, hermafroditismo e diminuição da fertilidade. Processos Oxidativos Avançados (POAs) têm sido bastante eficazes na remoção destes Desruptores Endócrinos, visto que estes poluentes persistem aos tratamentos convencionais. No entanto, em matrizes naturais, a transformação dos hormônios durante estes processos ainda não é bem compreendida, principalmente, no que diz respeito aos intermediários gerados e a sua toxicidade. Assim, este estudo buscou investigar o comportamento dos hormônios E1, E2, E3 e EE2 na degradação fotoquímica em amostras de água superficial, no que diz respeito a cinética, identificação de subprodutos e toxicidade. Na primeira etapa desta pesquisa foi feita a quantificação destes hormônios nas águas superficiais dos Rios Cubatão-SC e Marmeleiro-PR. Na segunda etapa, o comportamento fotoquímico dos hormônios, sob irradiação ultravioleta (UVC, 254 nm) associada a oxidantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou O<sub>3</sub>) ou ao fotocatalisador (TiO<sub>2</sub>), foi investigado para avaliar o potencial de degradação e a via de transformação em um ambiente aquático. Em relação aos resultados obtidos nas amostras das águas dos rios, no rio Cubatão foi detectado o E1, E3 e EE2, enquanto, nas águas do rio Marmeleiro foram encontrados o E2 e EE2. A cinética de degradação do E1, E2, E3 e EE2 (200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi estudada através de cromatografia líquida com espectrometria de massas (CG-MS) e os resultados se ajustaram ao modelo cinético de pseudo primeira ordem, sendo as constantes cinéticas:  $k_{E1} > k_{E2} > k_{EE2} > k_{E3}$ . Vários intermediários de transformação foram identificados por cromatografia líquida com espectrômetro de massas-tempo de voo (HPLC/TOF-MS) em amostras de água superficial, os quais foram provenientes da clivagem do anel aromático e adição do radical hidroxila. Muitos dos produtos identificados foram encontrados pela primeira vez em tratamentos com POAs. A maioria deles mostrou toxicidade crônica (ChV) muito tóxica para uma diversidade de espécies, segundo estimativa feita pelo software ECOSAR, o que

confirma que estes produtos podem apresentar risco ao meio ambiente. Ensaio de toxicidade aguda, utilizando a bactéria *Vibrio fischeri* foram feitos após as reações com a mistura dos hormônios e o tratamento UV/TiO<sub>2</sub> foi o mais tóxico para as bactérias. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para ampliar o conhecimento sobre a presença dos hormônios E1, E2, EE2 e E3 em rios brasileiros, além do mais, para compreender o comportamento fotoquímico na degradação destes hormônios em amostras ambientais. Possivelmente esta é a primeira vez que esses subprodutos foram confirmados em experimentos feitos em amostras com água superficial real.

**Palavras-chave:** Disruptores endócrinos. Água superficial. Estrógenos. Produtos de degradação.



## ABSTRACT

Natural hormones, such as estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), and synthetic, 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE2) are often detected in wastewater and surface water, causing concern because of their toxicity aquatic life at extremely low levels. More specifically, these substances classified as Endocrine Disrupters cause alarming effects, such as: feminization, hermaphroditism and decreased fertility. Advanced Oxidative Processes (POAs) have been quite effective in removing these Endocrine Disruptors, as these pollutants persist in conventional treatments. However, in natural matrices, the transformation of hormones during these processes is still not well understood, especially, with respect to the intermediates generated and their toxicity. Thus, this study aimed to investigate the behavior of the hormones E1, E2, E3 and EE2 in photochemical degradation in surface water samples, with respect to kinetics, by-product identification and toxicity. In the first stage of this research the quantification of these hormones in the surface waters of the Cubatão-SC and Marmeleiro-PR Rivers was done. In the second step, the photochemical behavior of the hormones under ultraviolet irradiation (UVC, 254 nm) associated with oxidants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or O<sub>3</sub>) or the photocatalyst (TiO<sub>2</sub>) was investigated to evaluate the degradation potential and transformation pathway in an environment aquatic. E1, E3 and EE2 were detected in the river waters samples, while E2 and EE2 were found in the waters of the river Marmeleiro. The degradation kinetics of E1, E2, E3 and EE2 (200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were studied by means of liquid chromatography with mass spectrometry (CG-MS) and the results were adjusted to the kinetic model of pseudo first order. kinetic constants:  $k_{E1} > k_{E2} > k_{EE2} > k_{E3}$ . Several processing intermediates were identified by liquid chromatography with mass-time-of-flight (HPLC / TOF-MS) spectrometer in surface water samples, which were derived from the aromatic ring cleavage and addition of the hydroxyl radical. Many of the identified products were found for the first time in POA treatments. Most of them showed very toxic chronic toxicity (ChV) for a diversity of species, according to an estimate made by ECOSAR software, which confirms that these products may pose a risk to the environment. Most of them showed very toxic chronic toxicity (ChV) for a diversity of species, according to an estimate made by ECOSAR software, which confirms that these products may pose a risk to the environment. Acute toxicity tests using *Vibrio fisheri*

bacteria were made after reactions with the hormone mixture and the UV / TiO<sub>2</sub> treatment was the most toxic to bacteria. The results obtained in this study contribute to increase the knowledge about the presence of the hormones E1, E2, EE2 and E3 in Brazilian rivers. Moreover, to understand the photochemical behavior in the degradation of these hormones in environmental samples, it is believed that this is the the first time these by-products were confirmed in experiments on samples with actual surface water.

**Key-words:** Endocrine disruptors. Surface water. Estrogens. Degradation products.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de excitação do fotocatalisador.	25
Figura 2 – Etapas envolvidas no SPE.	30
Figura 3 – Cartuchos posicionados durante a SPE.	33
Figura 4 – Cromatograma dos hormônios E1, E2, EE2 e E3.	35
Figura 5 – Cromatógrafo a gás GC/MS-QP2010 Plus, com sistema de injeção de líquidos automático (AOC-20i), Shimadzu.	35
Figura 6 – Localização dos dois pontos de coleta no Rio Marmeleiro – PR.	37
Figura 7 – Localização dos pontos de coleta no Rio Cubatão – SC.	37
Figura 8 – Esquema do reator fotoquímico utilizado no estudo.	39
Figura 9 – Cromatógrafo líquido HPLC/MS- (20AD-LC-MS, Shimadzu) com ionização por <i>electrospray</i> e tempo de voo quadrupolo (micrOTOF-Q II, Bruker Daltonik).	40
Figura 10 – Degradação dos hormônios nos processos UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e UV/TiO <sub>2</sub> e UV/O <sub>3</sub> . Condições: [E1=E2=EE2=E3] <sub>0</sub> =200 µg.L <sup>-1</sup> ; matriz água superficial; pH=7,2; T= 20±2; irradiação UVC. a) Degradação do E1. b) Degradação do E2. c) Degradação do EE2. d) Degradação do E3.	44
Figura 11 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do E1.	48
Figura 12 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do E2.	49
Figura 13 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do EE2.	50
Figura 14 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do E3.	52
Figura 15 – Toxicidade nas reações com a mistura de E1, E2, EE2 e E3 com POAs após 30 minutos.	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas dos hormônios E1, E2, EE2 e E3.	18
Tabela 2 – Excreção diária dos hormônios E1, E2, EE2 e E3 em $\mu\text{g}$ por homens e mulheres.	20
Tabela 3 – Método desenvolvido no cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas.	34
Tabela 4 – Pontos de coleta de amostras de água dos rios Cubatão e Marmeleiro.	38
Tabela 5 – Concentração dos hormônios nas águas superficiais do Rio Cubatão.	42
Tabela 6 – Concentração dos hormônios nas águas superficiais do Rio Marmeleiro.	43
Tabela 7 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV.	44
Tabela 8 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	44
Tabela 9 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV/TiO <sub>2</sub> .	45
Tabela 10 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV/O <sub>3</sub> .	45
Tabela 11 – Toxicidade crônica e aguda do E1 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub> .	54
Tabela 12 – Toxicidade crônica e aguda do E2 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub> .	55
Tabela 13 – Toxicidade crônica e aguda do EE2 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub> .	56
Tabela 14 – Toxicidade crônica e aguda do E3 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub> .	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CG/MS</b>	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
<b>ChV</b>	Toxicidade Crônica
<b>Des</b>	Desruptores Endócrinos
<b>EC50</b>	Toxicidade Aguda
<b>E1</b>	Estrona
<b>E2</b>	17 $\beta$ -estradiol
<b>EE2</b>	17 $\alpha$ -etinilestradiol
<b>E3</b>	Estriol
<b>GHS</b>	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
<b>LC/MS</b>	Cromatografia Líquida com Espectrômetro de Massas
<b>Kow</b>	Coeficiente de partição octanol-água
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozônio
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio Singlete
<b>•HO</b>	Radical hidroxila
<b>•HOO</b>	Radical hidroperoxil
<b>HPLC/MS</b>	Cromatografia Líquida com Espectrômetro de Massas
<b>HPLC/TOF-MS</b>	Cromatografia Líquida com Espectrômetro de Massas-Tempo de Voo
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>POAs</b>	Processos Oxidativos Avançados
<b>SPE</b>	Extração em Fase Sólida
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dióxido de titânio
<b>Uts</b>	Unidades Tóxicas
<b>UV</b>	Fotólise
<b>UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Foto-peroxidação
<b>UV/O<sub>3</sub></b>	Foto-ozonização
<b>UV/TiO<sub>2</sub></b>	Fotocatálise

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo Geral	15
1.1.2	Objetivo Específico	16
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
2.1	ESTROGÊNIOS SEXUAIS FEMININOS	17
2.1.1	Efeitos provocados pelos estrogênios	19
2.1.2	Ocorrência dos estrogênios no meio ambiente	19
2.2	MÉTODOS DE TRATAMENTO	20
2.2.1	Foto-ozonização	21
2.2.2	Fotólise	23
2.2.3	Fotocatálise heterogênea	24
2.2.4	Foto-peroxidação	26
2.3	INTERMEDIÁRIOS DE DEGRADAÇÃO DOS ESTROGÊNIOS	27
2.4	TOXICIDADE	28
2.5	MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>31</b>
3.1	REAGENTES E PADRÕES	31
3.2	MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS	32
3.2.1	Extração em Fase Sólida	32
3.2.2	Derivatização	33
3.2.3	Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (CG/MS)	33
3.2.4	Curvas de calibração	35
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS	36
3.4	ENSAIOS CINÉTICOS	38
3.5	IDENTIFICAÇÃO DOS SUBPRODUTOS	39
3.6	TOXICIDADE	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
4.1	QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS NAS ÁGUAS SUPERFICIAIS	42
4.2	CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DOS HORMÔNIOS	43
4.3	PRODUTOS DE TRANSFORMAÇÃO	47
4.3.1	Produtos e mecanismo de degradação do E1	47
4.3.2	Produtos e mecanismo de degradação do E2	49
4.3.3	Produtos e mecanismo de degradação do EE2	50
4.3.4	Produtos e mecanismo de degradação do E3	51
4.4	TOXICIDADE	53
4.4.1	Toxicidade do E1 e seus subprodutos	53
4.4.2	Toxicidade do E2 e seus subprodutos	54
4.4.3	Toxicidade do EE2 e seus subprodutos	55
4.4.4	Toxicidade do E3 e seus subprodutos	56
4.4.5	Toxicidade da mistura de E1, E2, EE2, E3 e seus subprodutos	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desruptores Endócrinos (DEs) são um grupo estruturalmente diverso de compostos que mimetizam ou antagonizam o efeito de estrogênios endógenos causando distúrbios das funções reprodutivas em humanos e animais (VILELA; BASSIN; PEIXOTO, 2018). Os estrogênios naturais, como estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3), assim como o sintético, 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), são desruptores endócrinos e possuem elevada atividade estrogênica (NAZARI; SUJA, 2016). E1 é o principal metabólito do E2, sendo o E2 um hormônio esteroide do sistema de mamíferos (HAKK; SIKORA; CASEY, 2018). O E3 é um hormônio natural produzido em mamíferas prenhas e no ciclo menstrual e reprodutivo das mulheres (SORNALINGAM; MCDONAGH; ZHOU, 2016b). Enquanto, o EE2 é o principal hormônio presente em pílulas contraceptivas.

Estes estrogênios são frequentemente liberados para o meio ambiente através de excreções de animais, efluente de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e escoamento agrícola. Devido a resistência à biodegradação, o tratamento convencional de efluentes não os remove completamente, quando assim, concentrações de E1, E2, EE2 e E3 são descarregadas ao meio aquático em nível significativo. Concentrações de até 9.900 ng.L<sup>-1</sup> de E1, 175.000 ng.L<sup>-1</sup> de E2, 34.000 ng.L<sup>-1</sup> de EE2 e 18.100 ng.L<sup>-1</sup> de E3 foram encontradas em águas superficiais na China, Estados Unidos e Europa (WEE; ARIS, 2017). A presença destes compostos, mesmo no nível de nanogramas, pode ocasionar efeitos alarmantes como: feminização de peixes, hermafroditismo, diminuição da fertilidade, menor produção de espermatozoide e alteração de outras características reprodutivas (ADEEL et al., 2017; VILELA; BASSIN; PEIXOTO, 2018). Dada a sensibilidade dos organismos aquáticos aos hormônios estrogênios, é importante reduzir sua concentração presente em águas superficiais.

A preocupação com a presença dos hormônios no meio ambiente fez com que a União Europeia tenha adicionado o E1, E2 e EE2 em sua lista de substâncias de observação (*watched list*) para monitoramento em suas águas superficiais (EUROPEAN COMMISSION, 2018). Tratamentos com Processos Oxidativos Avançados (POAs) usando luz UV e na combinação com ozônio (UV/O<sub>3</sub>), fotocatalisador (UV/TiO<sub>2</sub>) e peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) são altamente

eficientes na remoção do E1, E2, EE2 e E3 em águas superficiais. Sornalingam et al. (2016) compararam os comportamentos destes tratamentos de oxidação e encontraram valores de constantes cinéticas muito rápidas na degradação dos hormônios ( $0,058 - 0,177 \text{ min}^{-1}$ ). Apesar da remoção completa dos hormônios por POAs, os subprodutos gerados nos tratamentos em matrizes reais têm sido pouco pesquisados. Além do mais, muitos estudos de remoção de micropoluentes e disruptores endócrinos têm encontrado produtos mais tóxicos que o composto original (CHOW; LEUNG, 2019; WANG et al., 2018; ZHOU et al., 2018). Portanto, mais atenção deve ser dada à aplicação de POAs em águas reais relacionadas a identificação de subprodutos e análise de toxicidade.

Os objetivos deste estudo foram quantificar o E1, E2, EE2 e E3 nas águas de rios pertencentes a bacias hidrográficas distintas, Rio Cubatão Sul – SC e Rio Marmeleiro – PR. Investigar a cinética de degradação dos hormônios por tratamentos fotoquímicos em amostras do Rio Cubatão Sul em condições ambientais reais, identificar os produtos gerados, da degradação fotoquímica do E1, E2, EE2 e E3 em reações feitas com amostras da água do Rio Cubatão, SC, Brasil, bem como, propor mecanismos de degradação e avaliar a toxicidade dos tratamentos. Espera-se que os resultados possam alertar quanto a presença destes compostos no meio ambiente, também elucidar as transformações dos estrogênios quando submetidos aos POAs em um ambiente real e fornecer informações para otimizar os tratamentos de remediação de água.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral investigar o comportamento dos hormônios E1, E2, E3 e EE2 na degradação por fotólise (UV), foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fotocatalise heterogênea (UV/TiO<sub>2</sub>) e foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>) em amostras de água superficial do Rio Cubatão, no que diz respeito a cinética, identificação de subprodutos e toxicidade.



### 1.1.2 Objetivo Específico

Quantificar os hormônios estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3) em águas do Rio Marmeleiro – PR e no Rio Cubatão Sul – SC.

Estudar a cinética de degradação dos estrogênios através dos POAs: fotólise (UV), foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fotocatalise heterogênea (UV/TiO<sub>2</sub>) e foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>).

Analisar os produtos formados nas reações de POAs por Cromatografia Líquida com Espectrômetro de Massas-Tempo de Voo (HPLC/TOF-MS).

Analisar o potencial tóxico dos subprodutos de reação através do software ECOSAR.

Analisar o potencial tóxico das reações de mistura dos hormônios através de ensaios com a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

Este capítulo tem como objetivo fazer um levantamento da revisão bibliográfica para o entendimento das questões relacionadas à pesquisa. Portanto, é abordado o conceito de estrogênios sexuais femininos, dando ênfase a estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3), visando compreender as características desses compostos e seus efeitos adversos no meio ambiente. Em seguida, são apresentados os métodos existentes de tratamento para a remoção dos estrogênios e, para uma compreensão mais ampla sobre o assunto, são abordados mais detalhadamente os tratamentos por Processos Oxidativos Avançados (POAs) de fotólise (UV), foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fotocatalise heterogênea (UV/TiO<sub>2</sub>) e foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>). Na sequência, para ampliar o entendimento do assunto, foram relatados os produtos de transformação dos hormônios detectados em outros estudos. Posteriormente, um pouco sobre métodos de análise de toxicidade e, por fim, são apresentados os métodos de analíticos de quantificação dos hormônios.

### 2.1 ESTROGÊNIOS SEXUAIS FEMININOS

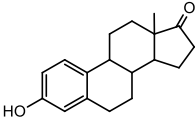
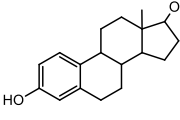
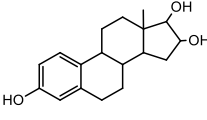
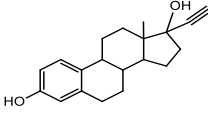
Os hormônios naturais são produzidos no organismo humano a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos ou estrógenos; hormônios sexuais masculinos ou andrógenos; e hormônios de gravidez ou progestrógenos (CUI; JI; REN, 2006). Os estrogênios são hormônios biologicamente ativos liberados pelo córtex adrenal, testículos, ovário e placenta em humanos e animais (ADEEL et al., 2017).

A estrona (E1), o estriol (E2) e o 17 $\beta$ -estradiol (E3) são hormônios estrogênios naturais predominantemente femininos, principais responsáveis pela manutenção dos tecidos reprodutivos, pele, mama e cérebro das espécies animais (MANICKUM; JOHN, 2014; SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012; ZHENG; YATES; BRADFORD, 2008). O 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) é um estrógeno artificial bastante utilizado em contraceptivos de uso oral (SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012). Os hormônios naturais também são produzidos sinteticamente e utilizados como

fármacos em terapia de reposição hormonal, tratamento de pré e pós menopausa, e no hipoestrogenismo (LAURENSEN et al., 2014).

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas dos quatro hormônios citados anteriormente. Os hormônios naturais E1, E2 e E3 apresentam solubilidade de aproximadamente 13 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto o hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE<sub>2</sub>) têm uma menor solubilidade de 4,8 mg.L<sup>-1</sup> (ADEEL et al., 2017). Todos possuem pressão de vapor muito baixa, indicando baixa volatilidade destes compostos, bem como, são ácidos fracos (pK<sub>a</sub> = 10,30-10,4) (ADEEL et al., 2017). O hormônio sintético possui maior coeficiente de partição octanol-água (K<sub>ow</sub>).

Tabela 1 – Características físico-químicas dos hormônios E1, E2, EE2 e E3.

Hormônios	Estrona	17 $\beta$ -estradiol	Estriol	17 $\alpha$ -Etinilestradiol
Estrutura				
Fórmula	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	270,4	272,4	288,4	296,4
pK <sub>a</sub>	10,3	10,2	10,34	10,4
Log K <sub>ow</sub>	2,95	4,01	2,45	3,67
Solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> )	13	13	13	4,8
Pressão (mm Hg)	3.10 <sup>-10</sup>	3.10 <sup>-10</sup>	6,7.10 <sup>-15</sup>	6.10 <sup>-9</sup>

Fonte: Adeel et al., (2017).

A partir das características físico-químicas dos esteroides (Tabela 1), pode-se observar que estes são compostos orgânicos hidrofóbicos de baixa volatilidade. Assim, a distribuição destes no ambiente dá-se, prioritariamente, por via aquosa, sendo bastante considerável a sorção destes no solo ou no sedimento devido ao significativo valor de log K<sub>ow</sub>. Em relação ao tempo de permanência no ambiente, estes degradam rapidamente no solo e na água apresentando um tempo de meia-vida de 2 a 6 dias (YING; KOOKANA; RU, 2002).

### 2.1.1 Efeitos provocados pelos estrogênios

Os estrógenos aparecem em pequenas quantidades no meio ambiente ocorrendo em níveis de  $\text{ng.L}^{-1}$  e  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , porém, mesmo em baixas concentrações são considerados compostos pseudo-persistentes capazes de causar efeitos adversos nos organismos aquáticos e terrestres (VILELA; BASSIN; PEIXOTO, 2018). Os estrogênios fazem parte da classe dos Desreguladores Endócrinos (DEs), grupo formado por poluentes como pesticidas e determinados químicos industriais, responsáveis por interferir no processo hormonal de animais e humanos devido à sua semelhança estrutural com os hormônios naturais (GIULIVO et al., 2016). A presença destes compostos no meio ambiente ocasiona efeitos adversos na função normal dos sistemas endócrinos dos seres vivos.

Diversos estudos relatam evidências de estes estarem relacionados a ocorrência de câncer de mama, testículo e próstata, disfunção reprodutiva e infertilidade em seres humanos (BLOOM; MICU; NEAMTIU, 2016; GIBSON; SAUNDERS, 2014; SHEIKH et al., 2017). No entanto, ainda não se sabe ao certo quais os efeitos da exposição humana a estes contaminantes e, a fim de avaliar isto muitos estudos têm sido realizados para analisar a saúde reprodutiva de outros organismos vivos. Por exemplo, o estudo de Caldwell et al. (2012) relata os efeitos ocasionados em diversas espécies de peixes expostos, sendo estes: feminilização, secreção de vitelogenina (uma proteína específica feminina), alterações de características reprodutivas, hermafroditismo, menor produção de espermatozoides e ovos, e infertilidade.

### 2.1.2 Ocorrência dos estrogênios no meio ambiente

A entrada dos estrógenos femininos e/ou seus metabólitos no meio ambiente pode ocorrer por diferentes vias. Todos os seres humanos, assim como os animais, excretam hormônios estrógenos que acabam no ambiente por descarga de esgoto e por disposição de resíduos animais (HANSELMAN; GRAETZ; WILKIE, 2003; ZHENG; YATES; BRADFORD, 2008). Há ainda, presença destes no descarte dos resíduos de indústrias farmacêuticas, hospitais, e estações de tratamento de esgoto (ETE), bem como, em emissões secundárias, como a disposição de lodo resultante

do tratamento de águas residuais e/ou excremento de animais em solos agrícolas (BILA; DEZOTTI, 2007).

Estes micropoluentes parcialmente degradados acabam sendo direcionados aos cursos de água e, como no meio ambiente as taxas de libertação são maiores do que as de transformação, encontram-se constantemente presentes (GROS et al., 2010). Pesquisas realizadas por diversos autores encontraram esses hormônios em águas superficiais brasileiras, por exemplo, no estado de São Paulo, Bergamasco *et al.* (2011) quantificaram 3,8 a 27,6 ng.L<sup>-1</sup> de estriol, Jardim *et al.* (2012) detectaram de 1,48 ng.L<sup>-1</sup> de 17β-estradiol e, em Belo Horizonte, Moreira *et al.* (2009) observaram estriol e 17α-etinilestradiol, nas concentrações de 1,5 a 54 ng.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em relação a excreção diária pelos seres humanos, a produção de estrogênios pelos homens é bastante reduzida em relação as mulheres, além disso, há uma variação na quantidade em função da idade, estado de saúde, dieta e ciclo reprodutivo (ZHENG; YATES; BRADFORD, 2008). Com base em pesquisas e medições prévias de excreção de estrogênio humano, Johnson *et al.* (2000) estimaram a excreção diária de estrogênios por homens e mulheres, dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Excreção diária dos hormônios E1, E2, EE2 e E3 em µg por homens e mulheres.

<b>Categoria</b>	<b>E1 (µg)</b>	<b>E2 (µg)</b>	<b>E3 (µg)</b>	<b>EE2 (µg)</b>
Homens	3,9	1,6	1,5	-
Mulheres menstruadas	8,0	3,5	4,8	-
Mulheres na menopausa	4,0	2,3	1,0	-
Mulheres grávidas	3.000	259	6.000	-
Mulheres	-	-	-	35

Fonte: Johnson; Belfroid; Di Corcia, (2000)

## 2.2 MÉTODOS DE TRATAMENTO

A fim de evitar os riscos potenciais que os estrogênios podem causar no meio ambiente faz-se necessária a sua remoção através da remediação das águas

dos rios e do solo. Os processos convencionais de tratamento não apresentam boa eficiência na remoção de micropoluentes resistentes a biodegradação, como os hormônios deste estudo. Assim, surge a necessidade de aplicar processos alternativos de tratamento e/ou complementar aos atuais. Neste contexto, três categorias de processos têm apresentado bons resultados na remoção de hormônios, sendo estes: tecnologia de membranas, adsorção e de processos oxidativos avançados (POAs) (SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012). Neste trabalho, será dado ênfase aos Processos Oxidativos Avançados empregados na etapa experimental, especificamente os processos de fotólise (UV), foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fotocatalise heterogênea (UV/TiO<sub>2</sub>) e foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>).

Os processos de oxidativos avançados podem mineralizar completamente os poluentes, ou seja, oxidá-los completamente e transformá-los em dióxido de carbono e água, ou então, convertê-los em subprodutos (IKEHATA; JODEIRI NAGHASHKAR; GAMAL EL-DIN, 2006). Contrariamente, processos como osmose inversa, nanofiltração e adsorção não degradam o contaminante, apenas o transferem de fase, sendo necessários procedimentos auxiliares, tais como tratamento ou deposição da fase sólida em que os poluentes estão concentrados (IKEHATA; EL-DIN; SNYDER, 2008; SIEVERS, 2011).

Os POAs oxidam os contaminantes através do aumento da concentração dos radicais hidroxila (HO•), um oxidante forte e não seletivo, durante as reações (GLAZE; KANG; CHAPIN, 1987; SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012). Além da geração de radicais hidroxila, muitos outros radicais livres (ROS) são produzidos, como o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e o hidroperoxil (•HOO) (RAZAVI et al., 2010; WANG et al., 2018). Estes radicais são formados a partir de agentes oxidantes como peróxido de hidrogenio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou ozônio (O<sub>3</sub>), e a sua formação pode ser acelerada pela combinação com radiação, ultravioleta ou visível, ou catalisadores (MELO et al., 2009).

### 2.2.1 Foto-ozonização

A foto-ozonização é um processo que visa utilizar o ozônio (O<sub>3</sub>), agente oxidante extremamente forte (E<sup>o</sup>=2,07 V), associado à irradiação de luz UV, para aumentar a geração de radicais livres produzidos comumente nas reações de

ozonização (SIEVERS, 2011). O ozônio é um gás que pode ser produzido por geradores que convertem o oxigênio (O<sub>2</sub>) ou a água (H<sub>2</sub>O) à O<sub>3</sub>, possui solubilidade 13 vezes maior que o O<sub>2</sub> e, desta forma, consegue ser transferido para o meio líquido com facilidade, porém, é um gás instável sob as condições normais de temperatura e pressão, apresentando um tempo de meia vida na água de segundos a minutos, o que impede o seu armazenamento (GUEDES MANIERO; MAIA BILA; DEZOTTI, 2008).

O agente oxidante O<sub>3</sub> é considerado um eficiente desinfetante aplicado atualmente no tratamento de água potável e efluente, têm também, apresentado potencial para remover os micropoluentes presentes nas águas e esgotos (AHMED et al., 2017). Além disso, os processos oxidativos avançados que empregam o uso de ozônio tem demonstrado capacidade de reduzir significativamente a atividade estrogênica dos efluentes, ou seja, são capazes de gerar subprodutos com menor estrogenicidade (ESPLUGAS et al., 2007; LARCHER et al., 2012; REUNGOAT et al., 2012).

A combinação do ozônio com radiação UV em uma matriz aquosa faz com que a reação ocorra em duas etapas: na primeira, a fotólise do ozônio em solução aquosa produz diretamente o peróxido de hidrogênio que subsequentemente inicia a decomposição do ozônio residual em radicais hidroxilas (equação da reação 1 a 4). No entanto, também ocorre a clivagem homolítica pela luz UV do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzindo também radicais hidroxila (equação da reação 5) (HOMEM; SANTOS, 2011).



Empregando doses de O<sub>3</sub> inferiores a 2 mg.L<sup>-1</sup> no tratamento de água contendo E1 e E2 estudos obtiveram remoções ótimas entre 96 e 100% (BILA; DEZOTTI, 2007; FERREIRA, 2008; ROKHINA et al., 2012). Também, estudo feito por Irmak; Erbatur; Akgerman (2005) aplicando foto-ozonização na remoção do E2 em dosagens que variam de 7.56 a 15.89 10<sup>-3</sup> mmol.min<sup>-1</sup> e tempos de reação de 45

a 90 minutos conseguiram remoções de até 100%. Também, notam-se constantes cinéticas elevadas na remoção dos estrógenos naturais e do sintético em reações com ozônio (LARCHER et al., 2012).

### 2.2.2 Fotólise

A fotólise é um processo que se baseia na emissão de energia luminosa e absorção desta radiação pelas moléculas alvo resultando em sua decomposição. Diferentes fontes de radiação podem ser utilizadas (natural ou artificial), como a luz solar e a radiação ultravioleta (UV), sendo a luz UV mais comumente empregada na desinfecção de água e efluentes (SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012). Esta radiação deve ser capaz de quebrar ligações químicas quando a energia do fóton absorvido é maior que a energia de ligação (KEEN et al., 2013). Desta forma, para que se tenha eficiência nesse processo, é necessário considerar o comprimento, intensidade e frequência de onda emitida pela lâmpada, bem como, a banda de adsorção do poluente e o tipo de matriz (KÜMMERER, 2009).

Dois tipos de fotólise podem ocorrer: a fotólise direta e a fotólise indireta. A fotólise direta é o resultado da absorção dos fótons pelos poluentes causando sua degradação. Os estrógenos possuem considerável absorbância na região espectral ultravioleta e azul (290-360 nm), sendo assim, acredita-se que a fotólise direta é importante para a degradação dos hormônios nos ambientes aquáticos (ROSENFELDT; LINDEN, 2004). Na fotólise indireta, espécies fotossensíveis que ocorrem naturalmente nas matrizes aquosas, tais como nitratos, nitritos, carbonatos e matéria orgânica formam oxidantes fortes, como oxigênio ou radical hidroxila capaz de degradar os poluentes em solução (HOMEM; SANTOS, 2011).

A fotólise pode ser uma forma econômica de remover hormônios estrogênicos, devido ao potencial de se utilizar a luz solar natural. No entanto, as taxas de remoção são baixas, por exemplo, de 40 a 75 dias foram necessários para 50% de degradação de E1, E2, E3 e EE2 sob irradiação solar direta (FRONTISTIS et al., 2011). Porém, a fotólise dos estrogênios com luz UV é um tratamento eficiente e rápido, devido à absorção da luz pelos grupos fenólicos e os grupos carbonilo que são fotossensíveis (LIU; ZHOU; WILDING, 2004). A maioria dos estudos em escala



de bancada mostrou um aumento na eficiência de fotólise na seguinte ordem: luz solar < UVA < UVB < UVC (SORNALINGAM; MCDONAGH; ZHOU, 2016b).

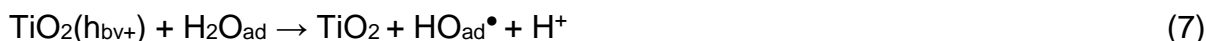
### 2.2.3 Fotocatálise heterogênea

As reações fotocatalíticas são uma combinação de fótons da luz solar ou UV com um material semiconductor foto-ativado, denominado foto-catalisador, para degradar os poluentes de uma forma mais rápida e efetiva (OHTANI, 2010). Os fotocatalisadores empregados nestas reações são pequenas partículas de materiais semicondutores (ex: Dióxido de Titânio –  $\text{TiO}_2$ , Óxido de Zinco –  $\text{ZnO}$ , Óxido de Ferro –  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , etc.) que devem ser fotoativos, possuir grande área superficial, serem não-tóxicos, estáveis e inertes (GMUREK; OLAK-KUCHARCZYK; LEDAKOWICZ, 2017).

Foto-catalisadores são normalmente materiais que possuem uma diferença de energia, denominada “band gap”, entre as bandas de valência (BV) e de condução (BC). No entanto, quando a absorção de luz visível ou UV pelo fotocatalisador for superior ao “band gap”, os elétrons do foto-catalisador migram da BV para BC gerando um par elétron-lacuna ( $e^-/h^+$ ) (LINDEN; MOHSENI, 2013). Em solução aquosa, radicais hidroxila altamente reativos são geradas devido à reação entre as lacunas formadas ( $h^+$ ) na BV e os íons  $\text{OH}^-$  ou moléculas  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvidas na superfície do catalisador (SORNALINGAM; MCDONAGH; ZHOU, 2016a). Outros compostos (RX) podem ser adsorvidos na superfície do catalisador e reagir com  $h^+$  ou  $e^-$ , como o  $\text{O}_2$  com a BC formando ânions superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ) (SORNALINGAM; MCDONAGH; ZHOU, 2016a). A Figura 1 ilustra o esquema de excitação do fotocatalisador.

Em relação ao mecanismo das reações fotocatalíticas, a etapa inicial refere-se a foto-excitação do fotocatalisador fazendo com que na sua superfície sejam gerados pares elétron-lacuna ( $e^-/h^+$ ) (equação 6). Desta forma, a banda de valência consegue oxidar as moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvidas na superfície do semiconductor gerando radicais hidroxila (equação 7). Também, moléculas orgânicas presentes em solução são passíveis de oxidação via lacuna fotogerada (equação 8). Além do mais, o oxigênio nessas reações impede a recombinação do par elétron-lacuna, sendo assim, funciona como um receptor de elétrons sendo reduzido a radicais

superóxidos que, posteriormente, geram  $\text{H}_2\text{O}_2$  (equações 9-11) (RIBEIRO et al., 2015).



O dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) é o fotocatalisador mais utilizado nas reações fotocatalíticas, sua elevada utilização decorre pelo fato deste apresentar fotoestabilidade, operar em condições ambientes, ter a capacidade de degradar diversos compostos químicos, boa disponibilidade comercial, baixo custo e não tóxico (XU et al., 2014). O  $\text{TiO}_2$  apresenta três formas cristalinas: rutilo, anatase e broquite; anatase é considerada a melhor forma devido a sua geometria favorecer o transporte de massa de elétrons para a superfície (LINDEN; MOHSENI, 2013). O Degussa P25 (~85% anatase e 15% de rutilo) é o mais comumente utilizado em reações fotocatalíticas na remoção de fármacos e estrógenos (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009).

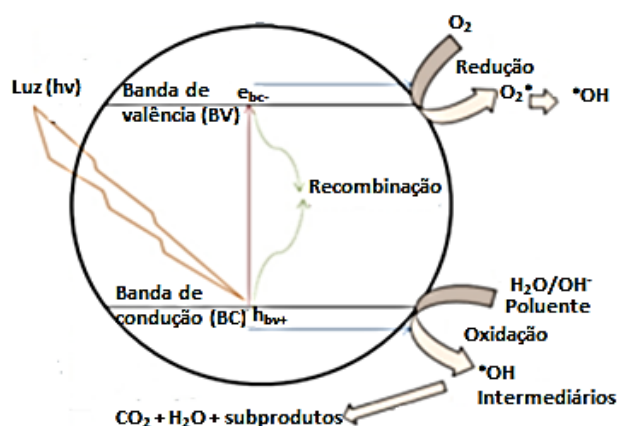


Figura 1 – Esquema de excitação do fotocatalisador.  
Fonte: Adaptado de Sornalingam; Mcdonah, Zhou, (2016a)

Os hormônios E1, E2, E3 e EE2 absorvem luz na mesma região UV que o  $\text{TiO}_2$  P-25 (SORNALINGAM; MCDONAGH; ZHOU, 2016a). A fotocatalise

heterogênea tem mostrado bons resultados na remoção de estrógenos conforme demonstrado por diversos autores (JASSO-SALCEDO et al., 2017; LARCHER et al., 2012; LI et al., 2017; REN et al., 2017; SARKAR et al., 2014; SORNALINGAM et al., 2018; ZHOU et al., 2012).

#### 2.2.4 Foto-peroxidação

A foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) consiste na adição de peróxido de hidrogênio na presença da luz UV para gerar radicais hidroxilas (HO•). Este processo oxidativo avançado tem como vantagem a utilização da radiação UV que pode funcionar simultaneamente como desinfetante, inativando fisicamente os microrganismos, e ajudando na fotólise do peróxido, quebrando-o no radical hidroxila (MIERZWA; RODRIGUES; TEIXEIRA, 2018). O peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é um forte oxidante químico (E° = 1,78 V), seguro, eficiente e de fácil uso. A UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende da absorção de energia UV pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para que ocorra a sua quebra e posterior formação do radical hidroxila (equação da reação 12), esta reação ocorre com rendimento quântico quase unitário ( $\phi_{HO\cdot} = 0,98$  a 254 nm) (LINDEN; MOHSENI, 2013).



Normalmente utilizam-se nestas reações lâmpadas que emitem luz em um comprimento de onda de 254 nm, no entanto, a absorvidade do peróxido de hidrogênio é baixa nesta região do espectro, sendo por isso necessário altas concentrações de oxidante para atingir níveis satisfatórios de degradação do poluente (BILA; DEZOTTI, 2007). Deve-se cuidar também para que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não esteja em excesso na reação, pois ele pode competir com o radical hidroxila e eventualmente inibir a oxidação dos compostos orgânicos alvo (CÉDAT et al., 2016). Além do mais, foto-peroxidação é uma reação dependente do pH, uma vez que em meio alcalino a dissociação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é favorecida formando o íon HO<sub>2</sub><sup>-</sup>, que apresenta maior absorvidade molar. No entanto, a elevação excessiva do pH prejudica o processo, devido ao sequestro de radicais hidroxila por íons carbonato e bicarbonato (BILA; DEZOTTI, 2007).

Diversos estudos demonstraram que o processo de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser viável para remover estrogênios de águas superficiais (PEREIRA et al., 2012) e águas residuárias (HANSEN; ANDERSEN, 2012). Outro estudo encontrou que após tratamento de 15 minutos de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mg.L<sup>-1</sup>) em uma matriz de esgoto sanitário poderia degradar quimicamente o EE2 (100%), porém com a atividade estrogênica apenas parcialmente removida (FRONTISTIS et al., 2015a).

### 2.3 INTERMEDIÁRIOS DE DEGRADAÇÃO DOS ESTROGÊNIOS

Os POAs, devido à reatividade com os compostos da matriz ou com os poluentes, podem gerar uma grande variedade de produtos de transformação, resultantes da não seletividade dos radicais gerados e, que podem desencadear caminhos complexos de reação (FATTA-KASSINOS; VASQUEZ; KÜMMERER, 2011). Assim, nestas reações, a redução da concentração do poluente não representa que o tratamento foi eficiente, pois, deve-se também conhecer outros parâmetros como, por exemplo, os compostos resultantes de sua degradação para analisar seus possíveis efeitos no meio ambiente.

Os produtos de transformação podem preservar o modo de ação do poluente ou até mesmo ser biologicamente mais ativo (SIRTORI et al., 2010). No caso dos estrogênios, os compostos podem vir a apresentar uma estrogenicidade similar ou maior (BILA; DEZOTTI, 2007; LEE; VON GUNTEN, 2009). A detecção e a quantificação de produtos de degradação dos estrogênios mostram-se como um desafio devido às baixas concentrações ambientais e à complexidade da solução da matriz (CHEN; KUO; DING, 2009). Os trabalhos desenvolvidos atualmente utilizam maiores concentrações destes poluentes para facilitar o uso das técnicas analíticas, ou seja, melhorar a sensibilidade. Estas técnicas envolvem o uso da cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas (CG/MS e LC/MS) (FRONTISTIS et al., 2015a; LI et al., 2017; MAZELLIER; MÉITÉ; DE LAAT, 2008; PEREIRA et al., 2011; REN et al., 2017). Esses métodos são altamente seletivos e sensíveis, assim proporcionam resultados confiáveis (FATTA-KASSINOS; VASQUEZ; KÜMMERER, 2011). Através do espectrômetro de massas (MS) obtêm-se o espectro de cada componente eluído e, a partir de comparações com a estrutura do composto parental, podem ser definidos os possíveis produtos.

Whidbey et al. (2012) obtiveram na fotodegradação do E1 a conversão parcial deste a luminoestronea composto com moderada estrogenicidade. Mai et al. (2008) observaram seis intermediários obtidos por oxidação fotocatalítica do E2, sendo estes: 2-hidroxiestradiol-10 $\epsilon$ -17 $\beta$ -di-hidroxi-1,4-estradien-3-ona (DEO), 10 $\epsilon$ -hidroperido-17 $\beta$ -hidroxi-1,4-estradien-3-ona e três tipos de ácidos dicarboxílicos formados pela abertura do anel aromático. Chen; Zhang; Zuo (2013), através de CG/MS, identificaram fotoprodutos de hidroxilação do E3 e propuseram uma via de fotodegradação. Frontistis et al. (2015), a partir da fotólise (solar e UV) do EE2, sugeriu principais vias de degradação envolvendo hidroxilação, alquilação, descomilação, desmetilação e desidroxilação.

Poucos estudos na literatura buscaram investigar a formação de produtos na degradação dos estrogênios em tratamentos com POAs, e, para facilitar a identificação, estes estudos foram feitos empregando água ultrapura ou deionizada. Entretanto, devido a complexidade de uma matriz real, há uma lacuna justificando a necessidade da realização de estudos que busquem compreender os mecanismos e os possíveis produtos gerados em matrizes reais, como em águas superficiais.

## 2.4 TOXICIDADE

Além da determinação dos produtos de degradação, é importante que seja avaliada a toxicidade do efluente gerado no tratamento com POAs. Desta forma, testes de toxicidade complementam as análises de identificação dos produtos de transformação e fornecem uma resposta global da amostra, identificando possíveis efeitos sinérgicos e biodisponibilidade dos compostos poluentes (MELO et al., 2009). Estes testes são realizados com diversos organismos e as metodologias estão padronizadas pelos órgãos ou institutos ambientais, como por exemplo, citam-se os testes com *Allium cepa* L. (ISO 5559), *Ceriodaphia dubia* (ABNT 13373) e *Vibrio fischeri* (ISO 11348-3).

Em estudos sobre produtos de transformação de fármacos e hormônios comumente analisa-se a toxicidade global da solução pelo teste Microtox (CÉDAT et al., 2016; FRONTISTIS et al., 2011; SURUJLAL-NAICKER; GUPTA; BUX, 2014). Este teste é baseado na alteração da luminescência da bactéria marinha *V. fischeri*, resultado da inibição da enzima luciferase bacteriana (FATTA-KASSINOS;

VASQUEZ; KÜMMERER, 2011). Estes são bioensaios rápidos, pois após a exposição a uma pequena quantidade de amostra, o organismo responde rapidamente a um vasto número de substâncias, podendo o efeito ser determinado num tempo de 5 a 30 minutos (ABBAS et al., 2018). Além do mais, estes testes são considerados simples e reproduzíveis (FATTA-KASSINOS; VASQUEZ; KÜMMERER, 2011).

Para análise de toxicidade dos produtos de transformação gerados separadamente o software ECOSAR tem sido amplamente utilizado nos casos de não haver padrões comerciais (USEPA, 2017). Recentemente, Melnikov et al. (2018) relataram que o ECOSAR é uma das ferramentas livre de avaliação de risco ecológico mais precisas. Neste programa as toxicidades agudas (LC50 e EC50) e crônicas (ChV) podem ser estimadas em três níveis tróficos para os peixes, algas verdes e *Daphnia* (USEPA, 2017). Neste programa, a previsão de contaminantes é realizada usando correlação de toxicidade experimental disponível com relações estrutura-atividade (SARs) (BURDEN et al., 2016).

## 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO

Devido às pequenas concentrações dos hormônios no meio ambiente, muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para detectar e quantificar estas substâncias em matrizes ambientais, tais como, águas superficiais (GROVER et al., 2009; WANG et al., 2011; ZHOU et al., 2012), água potável (KUSTER et al., 2009; VERBINNEN; NUNES; VIEIRA, 2010), sedimentos (WANG et al., 2011) e efluente de estações de tratamento de esgoto (MOHAGHEGHIAN et al., 2014; PESSOA et al., 2014). Estes métodos consistem em inicialmente realizar um preparo da amostra, através de filtração e extração e, posteriormente, analisa-la através de técnicas instrumentais (cromatografia gasosa ou líquida associada a um detector) ou não instrumentais (imunoensaio ou bioensaio) (FANG et al., 2016). Em relação às técnicas instrumentais, a cromatografia líquida é amplamente empregada, entretanto a cromatografia gasosa é uma alternativa viável, pois permite boa eficiência na separação dos compostos e também menor sensibilidade em relação ao efeito da matriz em amostras ambientais (CABAN et al., 2012).

A extração é a técnica de pré-concentração necessária para a determinação destes compostos, esta pode ser feita através da extração líquido-líquido ou através da extração em fase sólida (Solid Phase Extraction – SPE) (PACAKOVA et al., 2009). A SPE é a técnica mais comumente empregada devido a sua simplicidade, fácil automação, menor consumo de solventes e, por permitir concentrar um grande volume de amostra podendo desta forma, diminuir o limite de detecção do método de análise (CABAN et al., 2015). A SPE ocorre em discos ou cartuchos formados por um material adsorvente específico para reter o analito de interesse. Esta técnica envolve quatro etapas, sendo estas: (1) condicionamento do cartucho ou disco, através da passagem de um solvente adequado prepara-se o sorbente para interações eficazes com o analito; (2) extração dos analitos da amostra, o analito alvo é percolado lentamente; (3) lavagem do cartucho, eliminação das impurezas (interferentes) ligadas fracamente e (4) eluição dos analitos de interesse com solvente específico para posterior análise (LOCATELLI et al., 2016). Estas quatro etapas estão ilustradas na Figura 2.

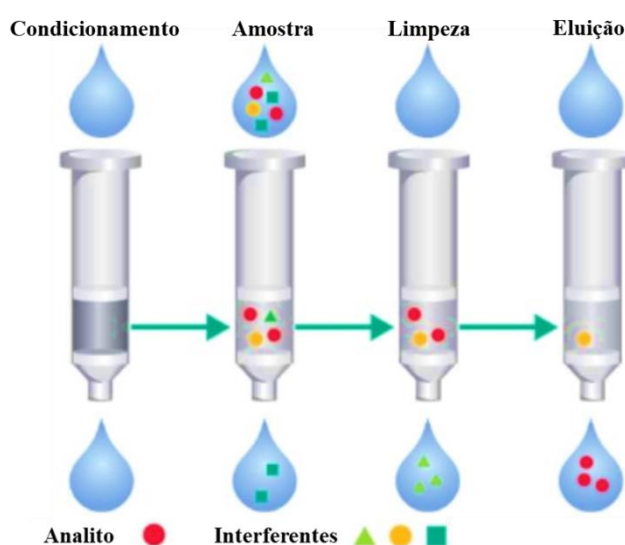


Figura 2 – Etapas envolvidas no SPE.

Fonte: Adaptado de Sornalingam; Mcdonah, Zhou, (2016a)

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Esta seção inicialmente aborda os reagentes e padrões utilizados nos ensaios cinéticos de degradação fotoquímica da estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3). Em seguida, apresenta a etapa de quantificação destes hormônios, que foi feita através da Técnica de Extração em Fase Sólida (SPE) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG-MS). Esta etapa de quantificação foi realizada para concentrar e quantificar os hormônios nas amostras de água do Rio Cubatão Sul-SC e Rio Marmeleiro-PR, descritos no tópico seguinte, e também, para quantificar os pontos coletados nos ensaios cinéticos. Posteriormente, os ensaios cinéticos serão explicados mais detalhadamente. Na sequência, é abordada a metodologia de identificação dos produtos de transformação por Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas (HPLC-MS). Por fim, são apresentadas as análises de toxicidade, primeiramente a análise feita com o software ECOSAR e, posteriormente, a análise feita com o Microtox.

#### 3.1 REAGENTES E PADRÕES

Para a realização do trabalho foram utilizados os padrões de hormônios estriol (Teor: 97%), 17 $\beta$ -estradiol (Teor: 98%), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (Teor: 98%) e estrona (Teor: 99%) da Sigma Aldrich. Bem como, os solventes e reagentes acetonitrila (Teor: 100%, Tedia Company), acetato de etila (Teor: 99,9%, Biograde), álcool metílico (Teor: 99%, Tedia Company), e isoctano (Teor 99%, Biograde), todos com grau HPLC, peróxido de hidrogênio (v/v 30%, Vetec), dióxido de titânio P25 (EvonikDegussa), água deionizada e destilada.

Foi utilizado papel filtro qualitativo comum, membrana filtrante mistura de ésteres de celulose da Millipore com porosidade de 0,45  $\mu$ m. O cartucho empregado na extração em fase sólida foi o SPE HLB (Supelco) com características hidrofílicas e lipofílicas (200 mg, 6 mL), também se utilizou o octadecilano C-18 (Applied Separation) e o manifold da Supelco. O reagente usado na etapa de derivatização foi o N-Metil-N (trimetilsilila)trifluoroacetamida ativado III (~5% imidazol, Sigma



Aldrich). Os gases para a secagem dos cartuchos foi o nitrogênio (grau de pureza 99,995%, White Martins) e para o cromatógrafo gasoso o Hélio (99,99% pureza, White Martins). O ozônio nas reações de foto-ozonização foi gerado a partir do ar ambiente em um ozonizador modelo ID-10 (O3R Philozon).

As soluções estoque de cada hormônio foram preparadas por dissolução de cada composto padrão na quantidade de 10 mg em 50 mL de álcool metílico. As soluções mix de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque para a concentração requerida no solvente acetonitrila. Houve a troca do solvente para as soluções mistas, pois o metanol poderia reagir com o agente derivatizante (DALLEGRAVE, 2012). Todas as soluções padrões e mix foram armazenadas a -22°C.

### 3.2 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS

As amostras das águas superficiais e os pontos coletados durante os processos fotoquímicos foram analisadas por um conjunto de técnicas analíticas para determinar a concentração dos hormônios deste estudo. Estas técnicas analíticas serão descritas a seguir e compreendem basicamente três etapas: extração em fase sólida, derivatização e a leitura no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro massas (CG/MS).

#### 3.2.1 Extração em Fase Sólida

O condicionamento do cartucho foi realizado com 5 mL de acetato de etila, 5 mL de metanol (sob baixo vácuo durante 5 minutos) e 10 mL de água deionizada (taxa de 1 mL.min<sup>-1</sup>). Posteriormente, foi percolada a amostra (taxa de 1 mL.min<sup>-1</sup>). Então, foi feito a lavagem com 10 mL de água deionizada e a secagem do cartucho com vácuo durante 30 minutos. A eluição foi feita com 3 mL (2 x 1,5 mL) de acetato de etila para a quantificação em amostras de água do Rio e, com 1,5 mL para o efluente coletado nas reações (vazão = 1ml/min). Por fim, o eluído armazenado em um vial foi seco com nitrogênio (N<sub>2</sub>). Essa metodologia de SPE foi adaptada de Liu; Zhou; Wilding (2004).

O pH 3 foi justado antes da SPE, para cada amostra, com a adição de ácido clorídrico, este ajuste visa diminuir a dissociação dos analitos e desta forma aumentar eficiência na etapa de SPE (LIU; KANJO; MIZUTANI, 2009). Também, nesta etapa foram utilizados cartuchos poliméricos (HLB), para a extração dos hormônios nas águas superficiais dos rios, e os cartuchos octadecil (C-18), nas amostras coletados durante as reações oxidativas avançadas. O manifold utilizado neste estudo está ilustrado na Figura 3.

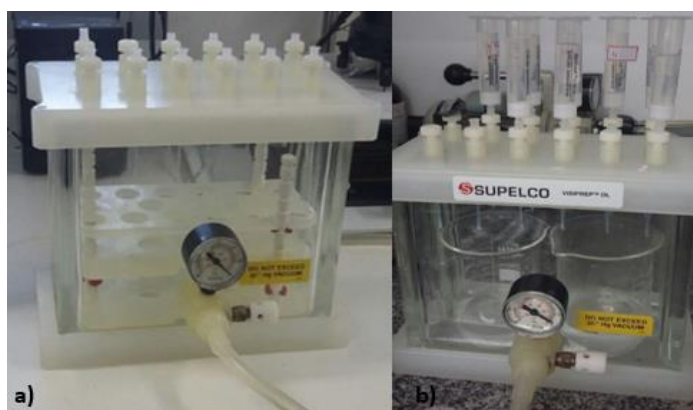


Figura 3 – Cartuchos posicionados durante a SPE.

Fonte: Autora, 2019.

### 3.2.2 Derivatização

Devido a baixa volatilidade dos hormônios deste estudo, para realizar análise no cromatografo gasoso foi necessário a etapa preliminar de derivatização ao eluído seco. Esta reação ocorreu com a adição de 50  $\mu$ L de derivatizante MSTFA ativado III no vial e posterior agitação por 30 segundos no vórtex. Então, foi feita a adição de 50  $\mu$ L do solvente isoctano. As reações ocorreram com temperatura controlada de 60°C em estufa por 30 minutos (adaptado de Liu et al., 2004). Após a derivatização, as soluções foram avolumadas a 1 mL com isoctano e analisadas por CG/MS.

### 3.2.3 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (CG/MS)

As determinações analíticas das concentrações dos hormônios por GC/MS foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso (GC-2010) acoplado a um

espectrômetro seletivo de massas (QP 2010 plus, Shimadzu) contendo um injetor automático (AOC-20i) (Figura 4). Uma coluna capilar de sílica fundida, da empresa Restek (USA), com 100% dimetilpolisiloxano como fase estacionária (RTX-1MS) e dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i e 0,25  $\mu\text{m}$  espessura de filme foi empregada. As condições cromatográficas estão apresentadas na Tabela 3, onde as temperaturas da rampa de aquecimento foram escolhidas baseadas no método desenvolvido por BOWDEN et al. (2009), na determinação de esteroides.

As condições de separação do cromatógrafo foram realizadas primeiramente com o espectrômetro de massas operando em modo de ionização por impacto de elétrons (*e.i.*) por análise no modo varredura (SCAN), sendo os íons monitorados em um intervalo de 50 a 500  $m/z$ , de uma solução mista dos analitos derivatizados. Esta etapa permitiu a determinação dos tempos de retenção de cada hormônio (Figura 5). Posteriormente, o CG/MS foi operado em modo de monitoramento de íons relativo (SIM), onde foram selecionados para cada hormônio os íons mais abundantes e os íons mais quantitativos a partir dos espectros de massas fornecidos pelo equipamento.

Tabela 3 – Método desenvolvido no cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas.

<b>Modo de injeção</b>	Splitless (1 $\mu\text{L}$ )
<b>T<sub>injetor</sub></b>	250 °C
<b>Vazão do gás de arraste He</b>	1 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Rampa de aquecimento</b>	150 °C (2 min); 150 ° – 300 °C (10 °C.min <sup>-1</sup> )
<b>T<sub>fonte de íons</sub></b>	200 °C
<b>T<sub>interface</sub></b>	250 °C
<b>Modo de análise</b>	SIM
<b>Íons monitorados no intervalo de aquisição de dados</b>	m/z = 342, 257, 115, 218, 343 /14 –14,3 min; m/z =285, 416, 232, 129, 326 /14,6–14,8 min; m/z=196,425, 285, 300, 440 /15,3–15,70 min; m/z =129, 345, 311, 504, 386 / 16,20 – 16,40.
<b>Tempo total de análise</b>	18 min

Fonte: Autora, 2019.

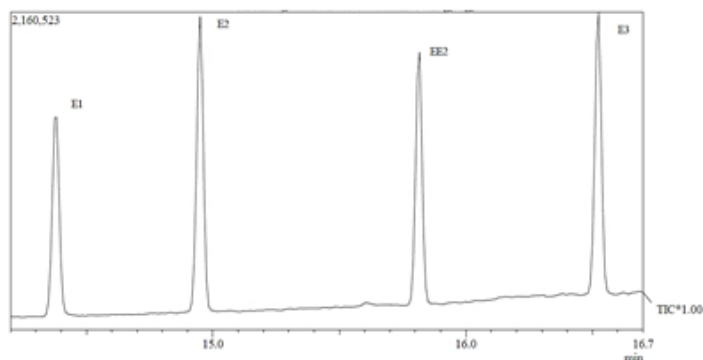


Figura 4 – Cromatograma dos hormônios E1, E2, EE2 e E3.

Fonte: Autora, 2019



Figura 5 – Cromatógrafo a gás GC/MS-QP2010 Plus, com sistema de injeção de líquidos automático (AOC-20i), Shimadzu.

Fonte: Autora, 2019.

### 3.2.4 Curvas de calibração

As concentrações dos analitos foram calculadas integrando as áreas de pico correspondentes a cada composto, no cromatograma e convertendo à respectiva concentração usando a equação da curva de calibração (Apêndice I) calculada através dos métodos dos Mínimos Quadrados. As soluções da matriz (água de rio) contendo os padrões dos quatro hormônios foram injetadas em quatro diferentes concentrações em duplicata. Os coeficientes de determinação  $R^2$  confirmam um ajuste linear satisfatório. A concentração mínima detectável ou limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LQ) do instrumento foram calculados com as equações 13 e 14 (HARRIS, 2012).

$$LD = \frac{3s}{m} \quad (13)$$

$$LQ = \frac{10s}{m} \quad (14)$$

Onde:

s: desvio padrão das medições feitas com amostras de padrão (controle).

m: coeficiente angular da curva de calibração.

### 3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de água do Rio Marmeleiro – PR e do Rio Cubatão Sul – SC foram coletadas para analisar a concentração de hormônios estrógenos femininos presentes. Foram escolhidas duas bacias hidrográficas com uso e ocupação do solo bastante distintos.

O Rio Marmeleiro está situado no município de Marmeleiro, localizado no sudoeste do Estado do Paraná. O município é essencialmente agrícola e aproximadamente 50% das propriedades rurais estão localizadas na bacia do Rio. Na Bacia Hidrográfica do Rio Marmeleiro predominam atividades agrícolas e agropecuárias. A bacia é o único manancial de abastecimento público do município.

A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul está localizada no Estado de Santa Catarina, englobando integralmente os municípios de Águas Mornas e Santo Amaro da Imperatriz, e parcialmente os municípios de São Pedro de Alcantra e Palhoça. Nesta bacia há uma intensa urbanização, atividades industriais e pontos de lançamento irregulares de esgoto. O Rio Cubatão Sul é um dos mananciais de abastecimento da região metropolitana de Florianópolis.

O volume amostrado foi de 500 mL, todo esse volume foi concentrado e analisado por CG/MS, conforme descrito nos itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3 deste estudo. Na Bacia do Rio Marmeleiro – PR foram escolhidos dois pontos de coleta, o primeiro próximo a uma região de descarte do efluente da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do município e, o segundo, em um local onde escoa uma parcela oriunda dos despejos da área urbana (Figura 6). Na Bacia do Rio Cubatão – SC escolheu-se um ponto de coleta próximo à entrada da Estação de Tratamento de Água (ETA) do município de Palhoça – SC que recebe preponderantemente cargas poluidoras de

origem doméstica (Figura 7). Na Tabela 4 estão apresentadas as coordenadas geográficas de cada ponto de amostragem.

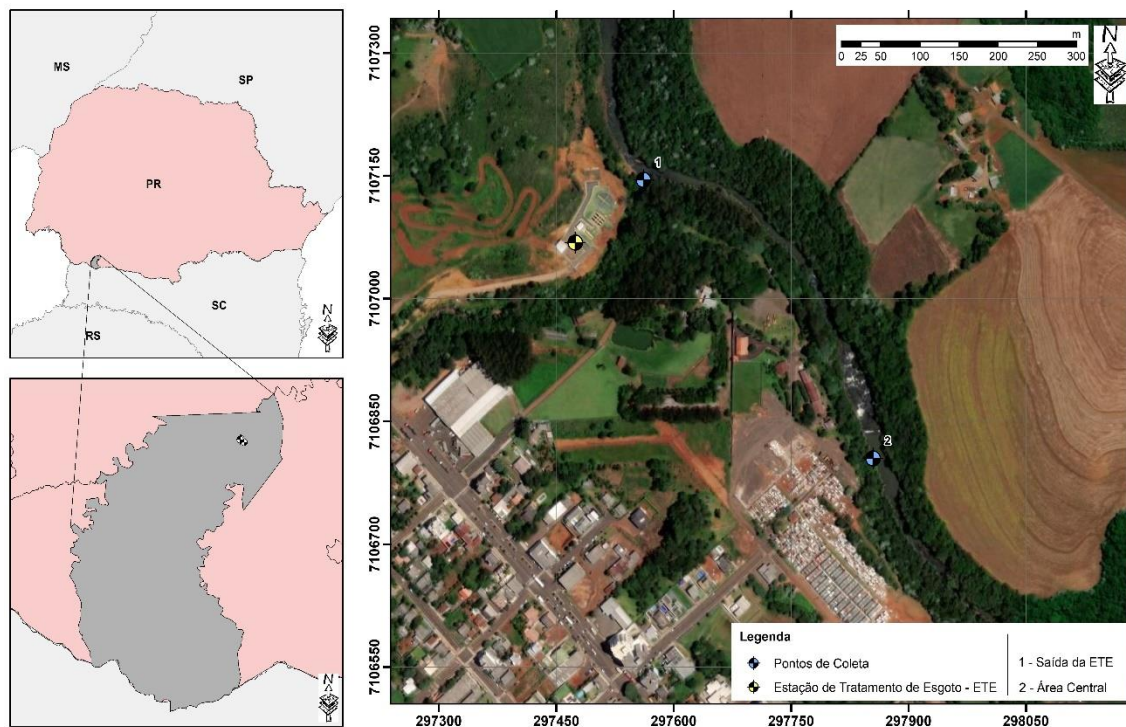


Figura 6 – Localização dos dois pontos de coleta no Rio Marmeleiro – PR.  
Fonte: Google Earth, 2018.

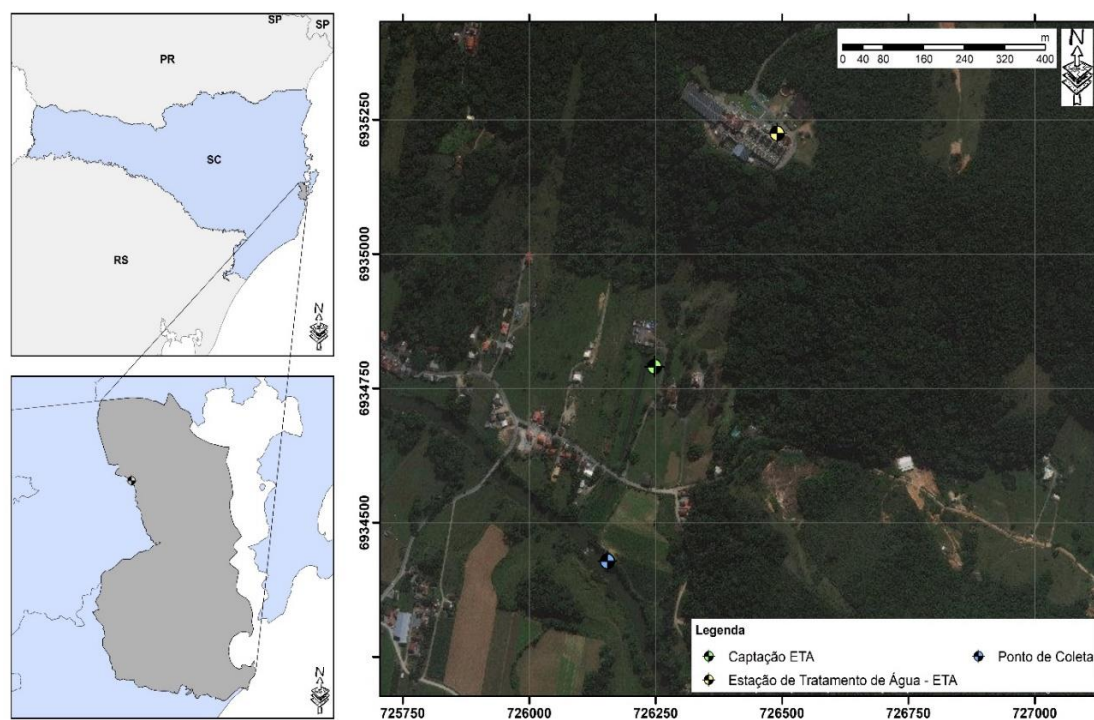


Figura 7 – Localização dos pontos de coleta no Rio Cubatão – SC.  
Fonte: Google Earth, 2018.

Tabela 4 – Pontos de coleta de amostras de água dos rios Cubatão e Marmeleiro.

Ponto Amostral	Latitude	Longitude
Ponto de Coleta Rio Cubatão Sul	27°41'31.54"S	48°42'20.76"O
Ponto de Coleta Rio Marmeleiro - Saída ETE	26° 8'26.94"S	53° 1'29.92"O
Ponto de Coleta Rio Marmeleiro - Área Central	26° 8'38.13"S	53° 1'19.56"O

### 3.4 ENSAIOS CINÉTICOS

Os experimentos de degradação fotoquímica dos hormônios foram realizados isotermicamente a  $20 \pm 2$  °C em um reator cilíndrico encamisado de volume útil de 1,5 L (35 cm altura e 10 cm de diâmetro) continuamente agitado (~500 rpm) com um agitador magnético. O reator era equipado com uma lâmpada UV-C (18 watts,  $\lambda=254$  nm) localizada axialmente no centro, com um tubo de proteção de vidro de quartzo (Figura 8). A parte externa deste tubo era revestida com papel alumínio para proteção externa da irradiação, permitindo assim, que os raios fossem refletidos para dentro do reator. Além disso, o reator era encamisado com tubo PVC e, na parte superior, havia uma tampa com dois furos que permitiam a introdução dos gases ( $O_2$  e  $O_3$ ) e a coleta do efluente. Para manter a temperatura constante do efluente no reator, manteve-se durante as reações circulação de água proveniente do banho maria.

Em um procedimento típico, um litro de água superficial com concentração inicial de  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  de E1, E2, EE2 e E3 foi transferido para o reator e uma quantidade específica de fotocatalisador ou peróxido de hidrogênio em suspensão (quando usados) foi adicionada. As quantidades de  $TiO_2$  e  $H_2O_2$  empregadas foram 50 mg e 15 mg, respectivamente. O oxigênio e o ozônio foram continuamente borbulhados no reator através de um difusor de ar com uma taxa de  $0.063 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$  nas reações de fotocatalise (UV/ $TiO_2$ ) e foto-ozonização (UV/ $O_3$ ). O reator foi operado em batealada por 60 minutos. Amostras de 5 mL foram coletadas em intervalos de 15 minutos em seguida filtradas em membrana PVDF ( $0,22 \mu\text{m}$ ) e encaminhadas para análise química. No ensaio de adsorção com o catalisador, os hormônios apresentaram adsorção inferior a 5%, sendo considerada desprezível.

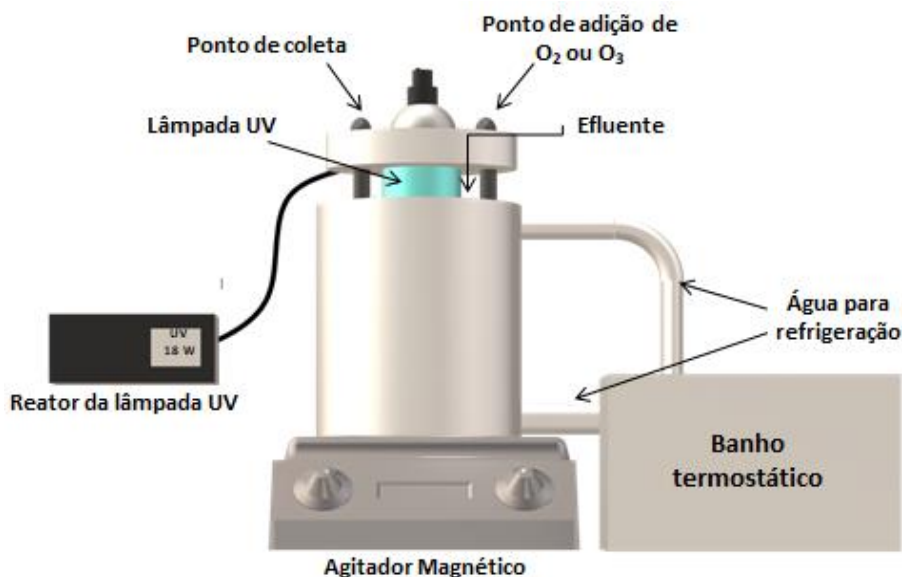


Figura 8 – Esquema do reator fotoquímico utilizado no estudo.  
Fonte: Autora, 2019.

As constantes de degradação ( $k_1$ ) do E1, E2, EE2 e E3 foram obtidas ajustando os dados ao modelo cinético de pseudo-primeira ordem (Eq.15).

$$-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = k_1 t \quad (15)$$

Onde,  $C_0$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e  $C$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) são a concentração inicial e a concentração após o processo oxidativo avançado em vários intervalos de tempo, respectivamente,  $k_1$  é a taxa constante de degradação de pseudo-primeira ordem do E1, E2, EE2 e E3 ( $\text{min}^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo de reação (min). A constante de velocidade de primeira ordem ( $k_1$ ) foi determinada pela inclinação da linha reta do ajuste de  $\ln(C/C_0)$  versus tempo.

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS SUBPRODUTOS

Para detectar os intermediários, os POAs foram aplicados com uma elevada concentração de E1, E2, EE2 e E3 ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em reações separadas com tempo de reação de 120 minutos e cinco pontos da reação foram concentrados em SPE. Os produtos das reações de degradação dos hormônios foram identificados por espectrometria de massas no instrumento HPLC/DAD-ESI-TOF-MS (20AD-LC-MS,



Shimadzu) com espectrômetro de massa de alta resolução com ionização por *eletrospray* e tempo de voo quadrupolo (microTOF-Q II, Bruker Daltonik) no modo full scan (Figura 9). Equipado com uma coluna Khromosil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å). A temperatura da coluna durante a análise foi uma isoterma de 40°C. Os gradientes de eluição foram água ultrapura (A) e acetonitrila (B). O método gradiente de eluição foi: 0 min, 40% B; 10-12 min, 85% B; 15-20 min, 40% B. Vazão de eluição 0,80 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi 50 µL. A análise de MS e MS<sup>2</sup> foi operada em modo positivo e negativo com faixa de massas 50-800 m/z. Os espectros de massas (MS e MS<sup>2</sup>) foram definidos pela função Dissect Compound e AutoMS(n) do software Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonik). A massa dos íons parentais protonados [M-H]<sup>+</sup> e dos desprotonados [M-H]<sup>-</sup> permitiu que fossem inferidas fórmulas moleculares dos produtos e estruturas. Através do software ChemDraw Ultra 12.0 a distribuição isotópica dos compostos foram obtidas e posteriormente comparadas com os espectros de massa dos produtos.



Figura 9 – Cromatógrafo líquido HPLC/MS- (20AD-LC-MS, Shimadzu) com ionização por *eletrospray* e tempo de voo quadrupolo (microTOF-Q II, Bruker Daltonik).

### 3.6 TOXICIDADE

As toxicidades agudas (LC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub>) e crônicas (ChV) dos hormônios e dos produtos de transformação foram estimadas em três níveis tróficos para os peixes, algas verdes e *Daphnia* utilizando o software ECOSAR v. 2.0 (USEPA, 2017). Neste programa, a previsão de contaminantes é realizada usando correlação de dados de toxicidade experimental disponível com relações de estrutura-atividade (SARs) (BURDEN et al., 2016). Os compostos deste estudo, por apresentarem múltiplas classes químicas, foram enquadrados em mais que uma das classes do programa

(QSARS), sendo necessário escolher a mais representativa com base no conhecimento de toxicologia ambiental e química orgânica.

Para os ensaios de toxicidade aguda, amostras de 10 mL foram coletadas no tempo de 30 minutos em cada reação contendo os quatro hormônios com concentrações de 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  cada e, posteriormente, introduzidas no Microtox. Pretendeu-se avaliar a toxicidade no tempo onde a reação forma maior número de produtos. Todas as análises foram realizadas com as amostras e duas replicatas de cada, de modo a verificar o efeito tóxico destas. Os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento descrito na norma ISO 11348-3, fazendo-se oito diluições: 80%, 50%, 33,33%, 25,0%, 16,67%, 12,5%, 8,33% e 6,25% as quais foram feitas com solução de NaCl 2%. Este teste de toxicidade forneceu o valor da  $\text{CE}_{50,30}$ , que é a porcentagem de uma amostra diluída (v/v) que provoca 50% de redução na bioluminescência das bactérias em 30 minutos de contato. Porém, a avaliação da redução da toxicidade aguda foi realizada através da transformação dos valores de  $\text{CE}_{50,30}$  em unidades tóxicas e foram obtidos pela equação 16.

$$\text{UT} = \frac{100}{\text{CE}(50)} \quad (16)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados da quantificação dos hormônios E1, E2, EE2 e E3 nas águas do Rio Marmeleiro e do Rio Cubatão por meio da análise de cromatografia gasosa. Posteriormente, serão apresentados os resultados referentes à cinética de degradação da mistura destes compostos em reações de UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub>, feitas em amostras de água do rio Cubatão. Buscando compreender melhor como ocorre a degradação destes hormônios na água do Rio, foram repetidas as reações com cada hormônio separadamente e, através de análises de Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas Tempo de Voo (HPLC/QTOF-MS), foram identificados os principais produtos de degradação. Assim, foi possível complementar e comparar com resultados de outros estudos existentes com produtos destes hormônios e também sugerir vias de reação. No que diz respeito à preocupação ecotoxicológica, na etapa final desta pesquisa foi feita determinada a toxicidade de cada subproduto para três espécies diferentes, através do software ECOSAR, e realizada análises da toxicidade aguda com as bactérias *Vibrio fischeri*.

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS NAS ÁGUAS SUPERFICIAIS

A quantificação do E1, E2, EE2 e E3 nas águas superficiais do Rio Marmeleiro e do Rio Cubatão Sul foi realizada através da utilização da equação da reta, referente a curva analítica de cada analito na matriz (Apêndice A). Na Tabela 5, são apresentadas as concentrações referentes às amostras coletadas nos meses de março e abril de 2018 no Rio Cubatão Sul. Enquanto, na Tabela 6 encontram-se os resultados da quantificação dos estrógenos encontrados na amostra coletada em abril de 2018 no Rio Marmeleiro, em dois pontos ao longo do rio. Os resultados considerados válidos foram aqueles onde a concentração obtida ultrapassou o limite de detecção do método estipulado para o analito.

Tabela 5 – Concentração dos hormônios nas águas superficiais do Rio Cubatão.

<b>Coleta - Rio Cubatão Sul</b>	<b>E1 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>E2 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>E3 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>EE2 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>
Março	41,2 ± 3,6	n.d	n.d	n.d
Abril	n.d.	n.d	44,6 ± 10,1	77,2 ± 5,7

Tabela 6 – Concentração dos hormônios nas águas superficiais do Rio Marmeleiro.

<b>Coleta - Rio Marmeleiro</b>	<b>E1 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>E2 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>E3 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>EE2 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>
Ponto 1 - Área Central	n.d	167,7 ± 6,7	n.d.	n.d
Ponto 2 – Saída ETE	n.d	n.d	n.d.	45 ± 5,3

Em relação aos resultados obtidos nas amostras do Rio Cubatão Sul foi detectado três dos quatro hormônios analisados, isto pode ser atribuído a sobrecarga de efluentes domésticos (tratados ou não) destinados para o rio. Em contrapartida, no Rio Marmeleiro observou-se o estrógeno sintético EE2 em um ponto próximo a ETE do município, o que pode estar associado a ineficiência da remoção destes poluentes na ETE ou lançamentos de esgoto bruto nas proximidades. A presença do E2 nas amostras do ponto 1, pode ser justificada devido ao esgoto doméstico, mas também as áreas com criação de animais localizadas nas proximidades da bacia, ou seja, devido a lixiviação de esterco animal ao corpo hídrico.

Em comparação aos resultados de outros trabalhos efetuados em rios brasileiros, Moreira *et al.* (2009), em estudo feito em três rios do município de Belo Horizonte – MG, encontraram E2 e EE2 em concentração de 1,5 a 54 ng.L<sup>-1</sup>. Em São Paulo– SP, Bergamasco *et al.* (2011) quantificaram valores inferiores aos encontrados neste trabalho para o hormônio estriol, variando de 3,8 a 27,6 ng.L<sup>-1</sup>, enquanto, Jardim *et al.* (2012) detectaram 1,48 ng.L<sup>-1</sup> de 17β-estradiol, valor bem inferior ao encontrado nas águas do Rio Marmeleiro (167,7 ± 6,7 ng.L<sup>-1</sup>).

## 4.2 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DOS HORMÔNIOS

A análise cromatográfica mostrou que o E1, E2, EE2 e E3 adicionados nas águas do Rio Cubatão, concentração de 200 µg.L<sup>-1</sup> cada, foram rapidamente removidos da água superficial por todos os POAs aplicados. Como mostrado na figura 10, a concentração destes compostos diminuiu exponencialmente com o tempo, sugerindo que todos os processos oxidativos se ajustaram bem a cinética de pseudo-primeira ordem. Em relação ao tratamento com POAs, as constantes cinéticas de todos os hormônios apresentadas na Tabela 7 a 10, seguiram a seguinte ordem  $k_{UV/O_3} > k_{UV/TiO_2} > k_{UV/H_2O_2} > k_{UV}$ . Também, comparando os valores das constantes cinéticas de cada hormônio, maiores taxas foram encontradas para E1 e

menores para E3, sugerindo a seguinte ordem decrescente de degradação: E1>E2>EE2>E3. Outros estudos constataram ordem semelhante de degradação, sendo a seguinte: E1>EE2>E2>E3 (CÉDAT et al., 2016; SORNALINGAM; MCDONAGH; ZHOU, 2016a).

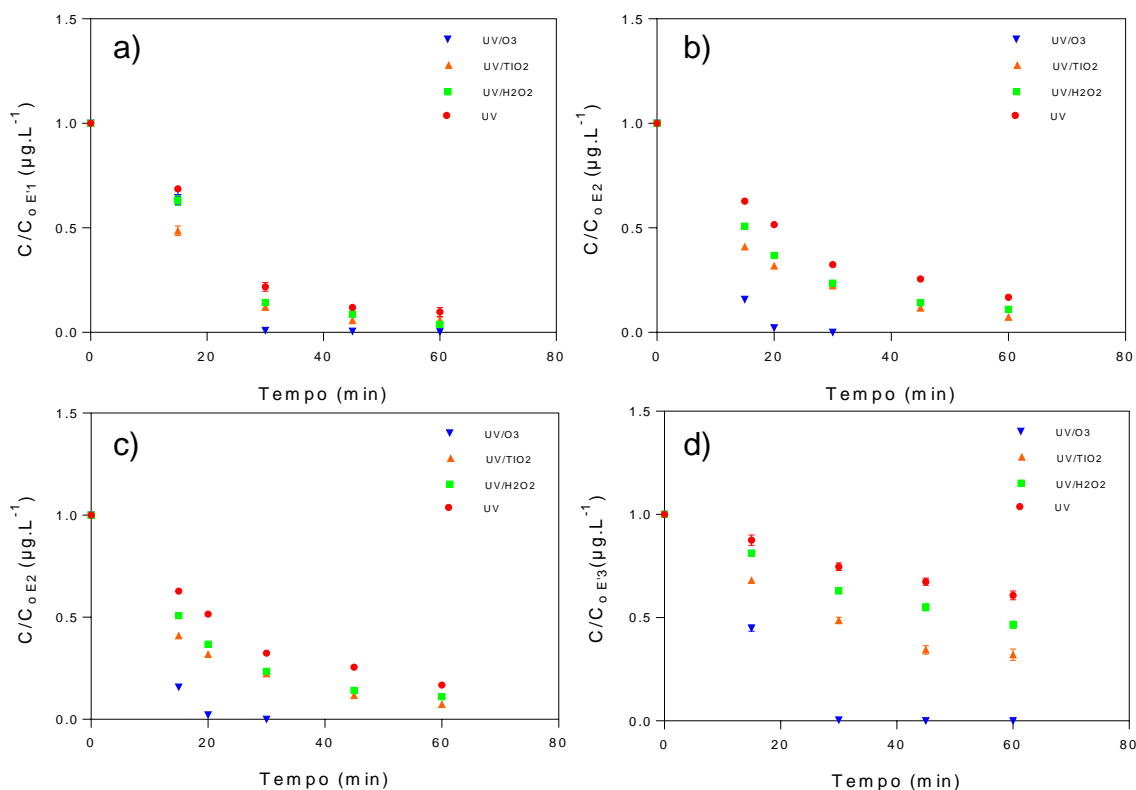


Figura 10 – Degradação dos hormônios nos processos UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub>. Condições: [E1=E2=EE2=E3]<sub>0</sub>=200 µg.L<sup>-1</sup>; matriz água superficial; pH=7,2; T= 20±2; irradiação UVC. a) Degradação do E1. b) Degradação do E2. c) Degradação do EE2. d) Degradação do E3.

Tabela 7 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV.

Hormônio	K1 (min <sup>-1</sup> )	Erro (ppm)	Correlação
E1	0,03745	0,0002	0,9551
E2	0,02955	0,0002	0,9802
EE2	0,02893	0,0005	0,9866
E3	0,00869	0,0004	0,9918

Tabela 8 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Hormônio	K1 (min <sup>-1</sup> )	Erro (ppm)	Correlação
E1	0.05256	0,0006	0,9748
E2	0.03785	0,0001	0,9715
EE2	0.03464	0,0006	0,9568
E3	0.01237	0,0003	0,9791

Tabela 9 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV/TiO<sub>2</sub>

Hormônio	K1 (min <sup>-1</sup> )	Erro (ppm)	Correlação
E1	0,07430	0,0001	0,9639
E2	0,04286	0,0001	0,9838
EE2	0,04202	0,0001	0,9716
E3	0,01865	0,0001	0,9664

Tabela 10 – Constantes cinéticas de E1, E2, EE2 e E3 na reação de UV/O<sub>3</sub>

Hormônio	K1 (min <sup>-1</sup> )	Erro (ppm)	Correlação
E1	0,1990	0,0003	0,9417
E2	0,1787	0,0001	0,9169
EE2	0,17715	0,0004	0,9428
E3	0,1624	0,0001	0,9057

Para entender a degradação dos hormônios algumas condicionantes de processo foram consideradas, inicialmente foram analisadas as relações entre a radiação utilizada e os compostos. Como possuem uma estrutura fenólica fotosensitiva, os estrogênios podem ser eficientemente reduzidos por fotólise (MAZELLIER; MÉITÉ; DE LAAT, 2008). De fato, na Figura 11, pode ser observado um decaimento considerável da concentração de cada hormônio nas reações utilizando UV somente. Como as reações foram feitas em uma água de rio, a fotólise pode ser direta, resultando na quebra dos hormônios, ou de forma indireta, devido aos fotossensibilizadores presentes na água natural. O comprimento de onda da lâmpada utilizada (UVC,  $\lambda=254$  nm) e a absorbância dos hormônios E1, E2 e EE2 são muito próximos (ZHANG; ZHOU; NING, 2007). Entretanto, o E3 é o único com considerável absorção de luz em uma região de comprimento de onda diferente da lâmpada empregada, absorvendo em um intervalo superior de 260-300 nm (CHEN; ZHANG; ZUO, 2013). Além do mais, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorve na faixa de 200–290 nm favorecendo a produção de radicais hidroxila no processo em que esse foi associado a irradiação (FRONTISTIS et al., 2015a).

O pH durante todos os experimentos manteve-se em uma faixa neutra (pH=7,2±2,0) e com pequenas variações. Como o objetivo da condução dos testes ficou restrito as condições naturais da água superficial coletada, variações neste parâmetro não foi investigada. Entretanto, outros estudos que avaliaram o efeito do pH na fotodegradação dos hormônios em solução com constituintes naturais reportam máxima degradação ocorrendo em torno de pH 7 (CHOWDHURY; CHARPENTIER; RAY, 2011; LIU et al., 2017). O valor de pKa de E1, E2, EE2 e E3 é

em torno de 10,4 sendo então suas remoções favorecidas em valores de pH mais altos ( $\text{pH} > \text{pKa}$ ). Além do mais, nas reações de UV/TiO<sub>2</sub>, a estabilidade do catalisador utilizado de ponto de carga zero 6,3 e a decomposição dos oxidantes em radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) são grandemente melhoradas sob condições neutras (BILA et al., 2007; VIEIRA et al., 2018). Portanto, a eficiência dos processos também pode ser atribuída ao pH ter se mantido neutro favorecido uma maior produção de radicais oxidativos.

A matriz pode desempenhar um papel essencial no rendimento das reações de degradação fotoquímica dependendo da presença de substâncias promotoras ou inibitórias (RIBEIRO et al., 2019). A presença de substâncias orgânicas e inorgânicas, como ácidos húmicos (HA), bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), cloretos (Cl<sup>-</sup>), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), presentes em águas naturais afetam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente, o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) (GRZYBOWSKI; SZYDŁOWSKI, 2014). Experimentos com sequestrantes de ROS demonstraram que os radicais  $\bullet\text{OH}$  são os principais responsáveis na degradação de hormônios (LI; ZHANG, 2014; NASUHOGLU; BERK; YARGEAU, 2012; REN et al., 2019). Desta forma, a cinética dos tratamentos deste estudo pode ser resultado da maior competição por radicais  $\bullet\text{OH}$ , devido à presença de espécies orgânicas e inorgânicas na água do rio Cubatão. Esta afirmação foi baseada em outros estudos feitos com EE2 e o E2 que encontraram relação positiva, ou seja, maiores taxas de remoção na presença de espécies fotossensibilizadoras (LIU et al., 2017; REN et al., 2017).

Para avaliar as constantes cinéticas de degradação fotoquímica do E1, E2, EE2 e E3, buscou-se o valor das mesmas em outros trabalhos da literatura a fim de compará-las. Lembrando que essas informações foram apresentadas nas Tabelas 7 – 10. Em um estudo de Sarkar et al. (2014) com foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>) do E1 em efluente doméstico a constante cinética obtida foi de  $k_{\text{UV/O}_3, \text{E1}} = 0,134 \text{ min}^{-1}$  valor semelhante ao encontrado neste trabalho que foi de  $k_{\text{UV/O}_3, \text{E1}} = 0,1990 \text{ min}^{-1}$ . Em outro estudo de fotólise (UV) e foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com concentração de 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de E2 em água ultrapura, as constantes cinéticas foram  $k_{\text{UV, E2}} = 0,06 \text{ min}^{-1}$  e  $k_{\text{UV/H}_2\text{O}_2, \text{E1}} = 0,018 \text{ min}^{-1}$  as quais, em comparação a este estudo, foram duas vezes inferior para a reação de UV e duas vezes superior para a reação de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MA; YATES, 2018). A constante cinética da fotocatalise do EE2 (5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) feita com

radiação UVC e em efluente industrial foi aproximadamente duas vezes superior, sendo o valor encontrado  $0,22 \text{ min}^{-1}$  (NASUHOGLU; BERK; YARGEAU, 2012). Em estudo com amostras de água de rio, aplicando radiação de diferente comprimento de onda (1,1 kW, 260-700 nm) e  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de E3, obteve  $k_{\text{UV,E3}}=1,2 \text{ min}^{-1}$ , aproximadamente 140 vezes superior ao  $k_{\text{UV,E3}}$  deste estudo. Enquanto, Zhang et al. (2014), aplicando UV e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comprimento de onda 253,7 nm, a E3 em resíduo de lodo ativado obtiveram constantes cinéticas semelhantes as obtidas neste estudo, sendo seus resultados  $k_{\text{UV,E3}}=0,005 \text{ min}^{-1}$  e  $k_{\text{UV/H2O2,E3}}=0,014 \text{ min}^{-1}$ . A discrepância dos valores das constantes cinéticas pode ser explicada por vários fatores, sendo os principais: matriz, radiação e geometria do reator.

### 4.3 PRODUTOS DE TRANSFORMAÇÃO

A análise HPLC/QTOFMS mostrou que os picos dos subprodutos parecem consistir em mais de um composto cada. Embora esta mistura de subprodutos do E1, E2, EE2 e E3 proveniente das reações com UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub> tenha sido, em sua maioria, não resolvida, foram identificados os íons [M-H]<sup>-</sup> ou [M-H]<sup>+</sup> nos espectros de massa correspondentes a possíveis produtos de transformação e confirmados através da sua distribuição isotópica. Embora cada tratamento apresente suas especificidades, seu mecanismo geral pode ser considerado essencialmente o mesmo. Neste estudo foi considerado um mecanismo de degradação por hormônio contemplando os produtos identificados em todas as reações de UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub>. Informações de estudos prévios mostram que a oxidação dos hormônios ocorre preferencialmente no anel aromático (SOUISSI et al., 2012). Desta forma, nos mecanismos sugeridos a adição dos radicais oxidativos foi predominantemente feita no anel aromático destes compostos.

#### 4.3.1 Produtos e mecanismo de degradação do E1

Nas reações de degradação do E1 foi identificado um total de 14 produtos de transformação, sendo 8 formados pela clivagem do anel aromático e 6 produtos por adição de radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ). Todos os produtos detectados foram enumerados de acordo com seu tempo de retenção e estão apresentados no



Apêndice B e os espectros de massa no Apêndice C. Na Figura 11, estes produtos são apresentados no mecanismo de degradação fotoquímica proposto para o E1. Este estudo identificou 6 novos produtos da degradação do E1 que ainda não haviam sido reportados na literatura e identificados na Figura 11 como: 2 (350 m/z), 3 (304 m/z) e 12 (288 m/z). Destes produtos, os identificados pelos números 3 (304 m/z), 11 (286 m/z) e 14 (300 m/z) foram produzidos em todas as reações e, o fato destes serem provenientes de adição do radical  $\cdot\text{OH}$  implica que possivelmente esse é um dos principais radicais que explicam a redução do E1.

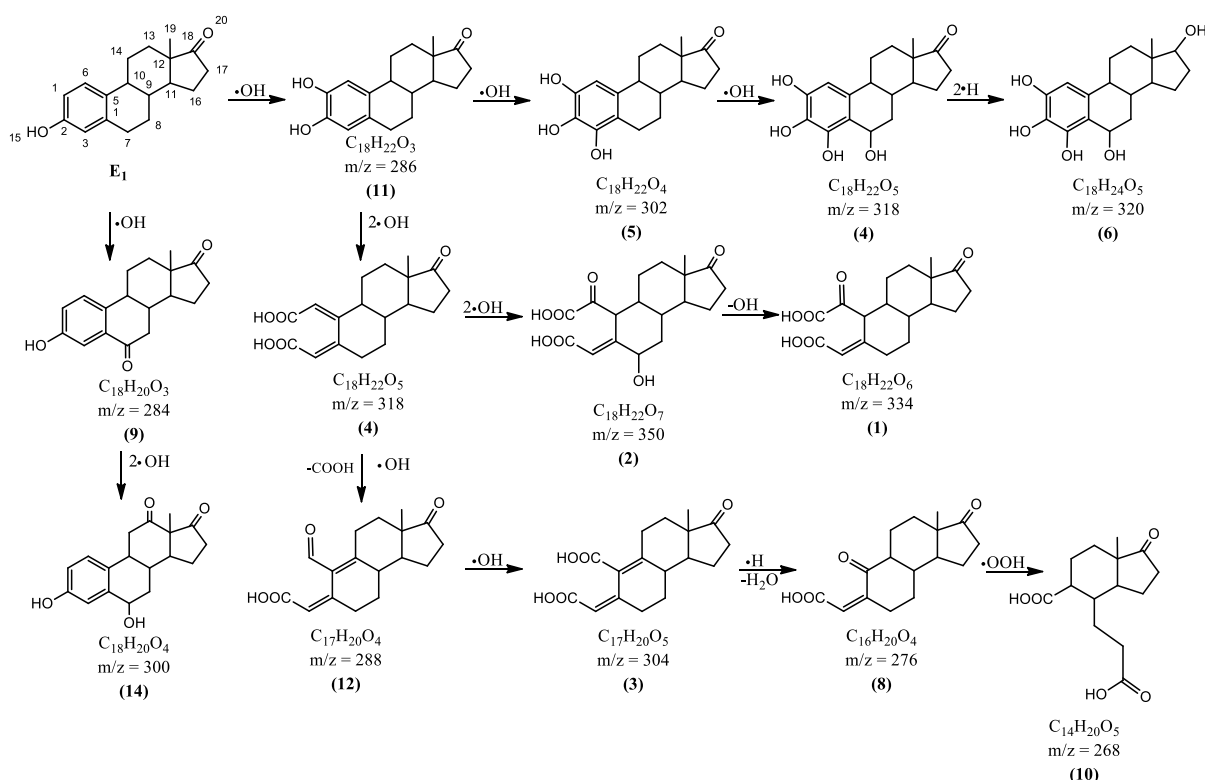


Figura 11 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do E1.

Os compostos 11 e o 5 (286 m/z e 302 m/z) encontrados neste estudo são produtos monohidroxilados e bihidroxilados possivelmente formados pela mesma reação e, frequentemente, detectados em trabalhos que empregaram os POAs como forma de tratamento do E1 (CAUPOS; MAZELLIER; CROUE, 2011; SOUSSI et al., 2012; TRUDEAU et al., 2011). Além do mais, muitos dos subprodutos detectados foram os mesmos encontrados em reações de fotólise em matrizes de águas naturais, sendo estes os subprodutos: 5 (302 m/z), 6 (320 m/z), 7 (318 m/z), 9 (284 m/z), 11 (286 m/z) e 15 (300 m/z) (SOUSSI et al., 2012). Em estudos de

ozonização do E1 os produtos 11 (286 m/z), 10 (268 m/z) e o 8 (276 m/z) também foram identificados (HUBER; TERNES; VON GUNTEN, 2004; PEREIRA et al., 2011).

#### 4.3.2 Produtos e mecanismo de degradação do E2

Nas reações de degradação do E2 um total de 8 subprodutos foram identificados. Todos os produtos detectados foram enumerados de acordo com seu tempo de retenção e estão apresentados no Apêndice D e E deste trabalho. Na Figura 12, estes produtos são apresentados no mecanismo de degradação fotoquímica proposto para o E2. Este estudo é um dos poucos que identificou produtos resultantes da abertura do anel aromático de E2, sendo estes identificados como 1 (352 m/z), 2 (336 m/z), 7 (354 m/z), 8 (324 m/z) e 9 (340 m/z). Os produtos 2 e 7, também foram detectados por Mai et al. (2008), em estudo de degradação fotocatalítica do E2. O E2 é o hormônio natural com mais potente atividade estrogênica devido ao seu grupo fenólico (HUBER; TERNES; VON GUNTEN, 2004). Desta forma, a quebra deste grupo durante a sua oxidação, formando produtos com as estruturas detectadas neste estudo, poderia reduzir os efeitos estrogênicos do E2 na água do rio.

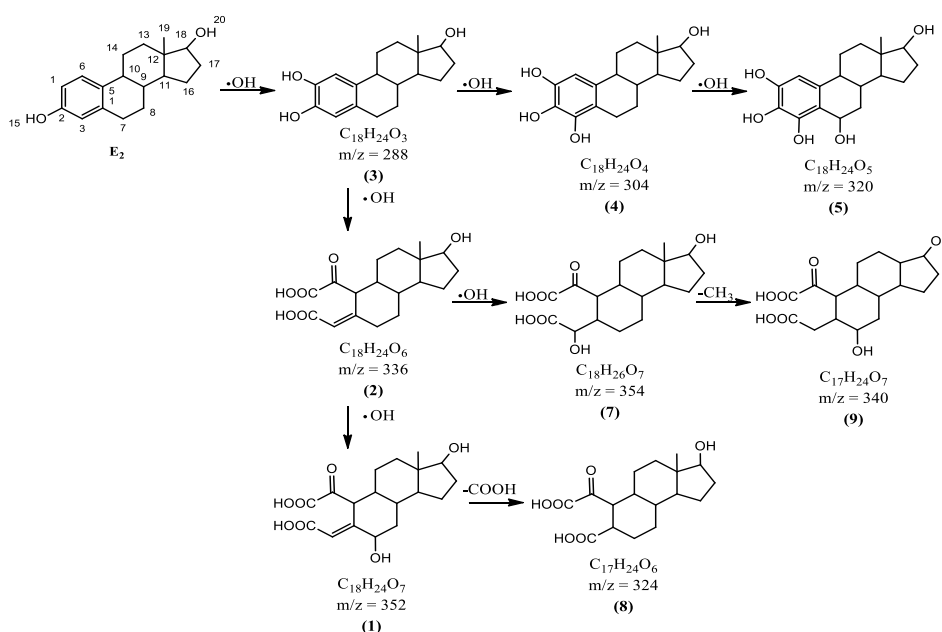


Figura 12 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do E2.

Os estudos que analisaram os intermediários e as vias de degradação do E2, em tratamentos com POAs, encontraram como principais os produtos formados por adição do radical hidroxil no grupo fenólico do E2, gerando produtos hidroxilados. Os produtos identificados neste estudo como 3 (288 m/z), 4 (304 m/z) e 5 (320 m/z) foram também detectados nos estudos de degradação fotoquímica de Díaz et al. (2009), Mai et al. (2008) e Mboula et al. (2015). Entretanto, nestes estudos os experimentos foram feitos em água ultrapura. Assim, o presente estudo confirma a existência destes compostos nas reações em amostras de água superficial.

#### 4.3.3 Produtos e mecanismo de degradação do EE2

Nas reações de degradação do EE2 um total de 19 subprodutos foi identificado. Todos os produtos detectados foram enumerados de acordo com seu tempo de retenção e estão apresentados na Tabela do apêndice F e G deste trabalho. Na Figura 13, estes produtos são apresentados no mecanismo de degradação fotoquímica proposto para o EE2.

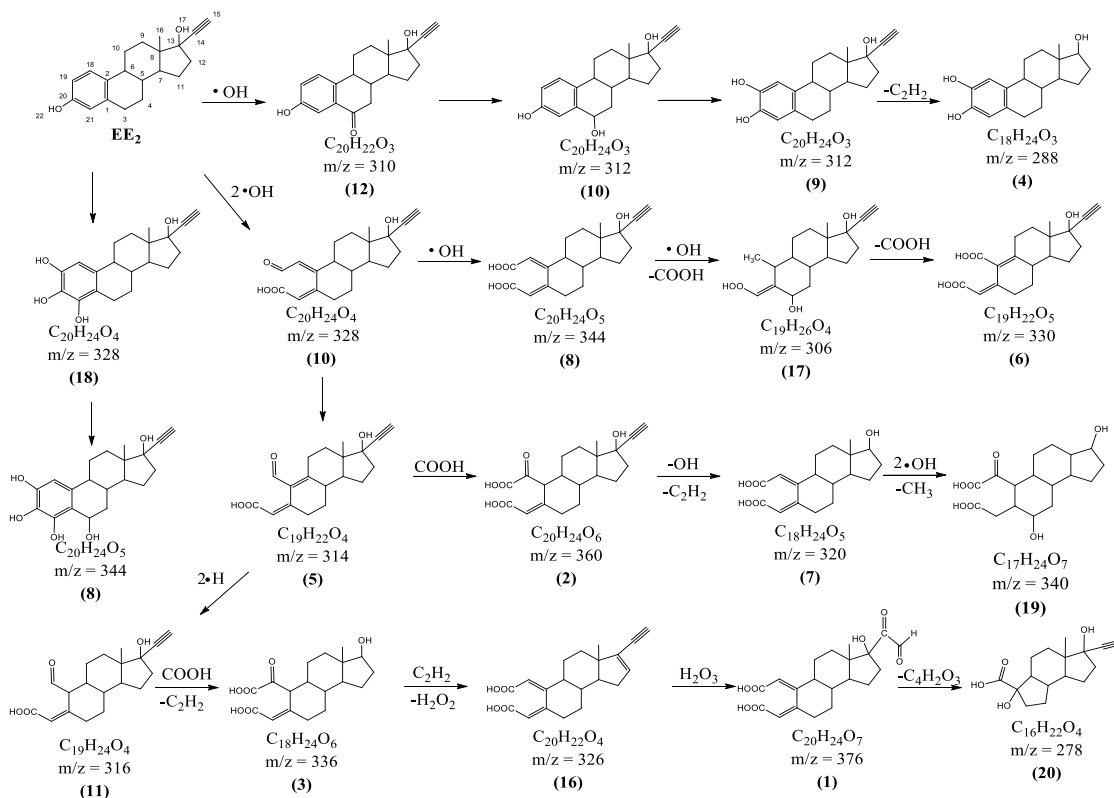


Figura 13 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do EE2.

A formação dos subprodutos da Figura tem sido observada durante as investigações de vias de reação do EE2 com POAs (FRONTISTIS et al., 2012; REN et al., 2017; SUN et al., 2010). No entanto, acredita-se que esta é a primeira vez que esses subprodutos foram confirmados em experimentos feitos com amostra de água superficial real. Embora estudos prévios previssem a estrutura de vários subprodutos dos POAs, apenas poucos deles realizaram reações com matrizes reais para investigar a alteração do hormônio. A maioria dos produtos de transformação encontrados foram resultantes da clivagem do anel aromático e apresentaram grupos carbonil, carboxil e hidroxil em suas estruturas. Compostos de maiores massas e com menores tempos de retenção foram detectados nas reações de UV/O<sub>3</sub> identificados como 1, 2, 3, 5, 6 e 8 na Figura 13. Os produtos de transformação 311 m/z (9) e 327 m/z (15) foram produzidos em todas as reações.

Os compostos 9 (311 m/z), 10 (327 m/z) e 15 (311 m/z) são produtos monohidroxilados e bihidroxilados possivelmente formados pela mesma reação e frequentemente detectados em trabalhos que empregaram os POAs como forma de tratamento do EE2 (FRONTISTIS et al., 2012, 2015b; MAZELLIER; MÉITÉ; DE LAAT, 2008; REN et al., 2016; SEGMULLER et al., 2000; VIEIRA; NASCENTES; AUGUSTI, 2010). Estes mesmos produtos de transformação também foram encontrados em análises feitas por Frontistis et al. (2015b) após reações de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em uma matriz real de esgoto secundário. Os produtos 2 (359 m/z), 5 (313 m/z), 12 (309 m/z), 13 (343 m/z), 9 (311 m/z), 15 (311 m/z) e 10 (327 m/z) foram os mesmos reportados na degradação do EE<sub>2</sub> por processo fotocatalítico (SUN et al., 2010). Estes produtos foram nomeados pelos autores como: 1-oxo diacid EE2 1-oxo-4-OH, 1-formyl dienoic EE2, 6-oxo EE2, muconic EE2, 17a-ethynyl-hydroxy-1,4-estradien-3-ona (EEO), 1-hidroxyllated-EE2 (1-OH-EE2), 7-hidroxyllated-EE2 (7-OH-EE2) e 2-formyl monoacid EE2 (SUN et al., 2010).

#### 4.3.4 Produtos e mecanismo de degradação do E3

Nas reações de degradação do E3 um total de 12 subprodutos foi identificado. Todos os produtos detectados foram enumerados de acordo com seu

tempo de retenção e estão apresentados nos apêndices H e I deste trabalho. Na Figura 14, estes produtos são apresentados no mecanismo de degradação fotoquímica proposto para o E3. Este estudo é o primeiro a identificar produtos resultantes da abertura do anel aromático de E3, sendo estes os produtos identificados como 6 (270 m/z), 7 (286 m/z), 8 (298 m/z), 9 (308 m/z), 10 (368 m/z), 11 (322 m/z), 12 (356 m/z) e 13 (306 m/z). O E3 é um hormônio pouco estudado, portanto, poucos estudos analisaram os intermediários e as vias de degradação em tratamentos com POAs. Em um estudo foi identificado o produto também encontrado neste estudo identificado como 3 (304 m/z) (CHEN; ZHANG; ZUO, 2013).

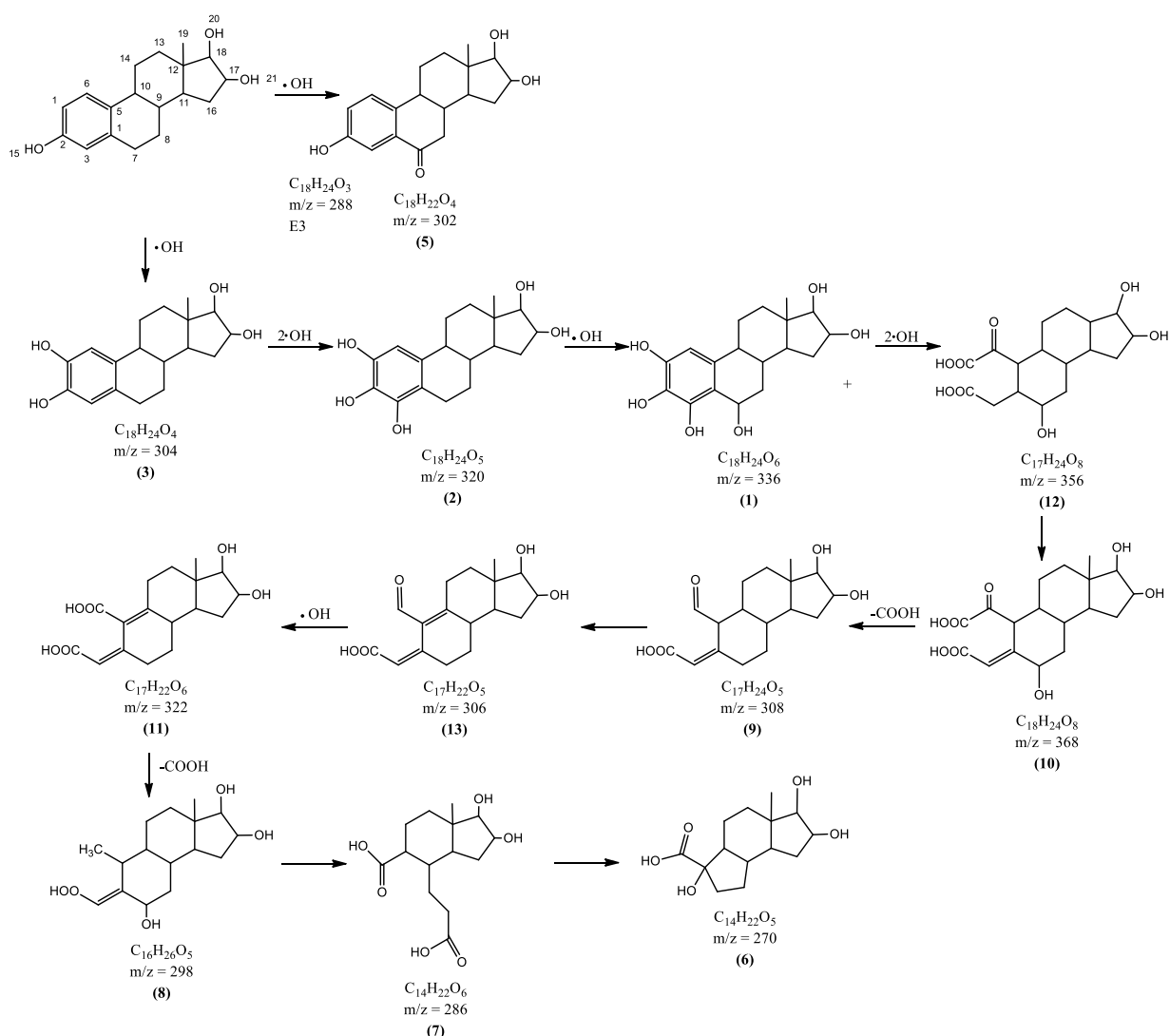


Figura 14 – Mecanismo proposto na degradação fotoquímica do E3.

## 4.4 TOXICIDADE

Sabendo da importância de conhecer a toxicidade de cada um dos produtos identificados e dos hormônios, neste estudo foi utilizado um programa que prevê a toxicidade aguda (LC50 e EC50) e crônica (ChV) para os organismos peixes, algas verdes e *Daphnia*. Com base nos valores previstos, o nível tóxico dos compostos foi classificado de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), sendo: muito tóxico ( $LC_{50}/EC_{50}/ChV \leq 1$ ), tóxico ( $1 < LC_{50}/EC_{50}/ChV \leq 10$ ), prejudicial ( $10 < LC_{50}/EC_{50}/ChV \leq 100$ ), não prejudicial ( $LC_{50}/EC_{50}/ChV > 100$ ). Posteriormente, para compreender melhor a toxicidade aguda entre os tratamentos, foi feita a medição da toxicidade com bactérias *Vibrio fisheri* no equipamento Microtox.

### 4.4.1 Toxicidade do E1 e seus subprodutos

A Tabela 11 apresenta os valores das toxicidades crônica e aguda do E1 e de seus subprodutos. O E1 foi o que apresentou pelo menos em um parâmetro de toxicidade (aguda ou crônica) elevada para todos os organismos avaliados (algas verdes, peixes e *Daphnia*). Os subprodutos de E1, em todos os tratamentos realizados no presente estudo (UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub>, UV/O<sub>3</sub>), apresentaram diferentes níveis de toxicidade para as espécies testadas pelo programa, sendo que a espécie mais sensível foi a de algas verdes. Desta forma, a espécie algas verdes pode ser considerado o bioindicador mais adequado para avaliar a toxicidade em tratamentos com o E1.

Em comparação entre os tratamentos aplicados, a oxidação de E1 com UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub> apresentou predominantemente produtos de maior ecotoxicidade, enquadrados como tóxicos e muito tóxicos, sendo assim, considerados os tratamentos mais prejudiciais aos organismos testados. Entretanto, muitos dos produtos identificados no tratamento com UV/O<sub>3</sub> foram não prejudiciais, assim, pesquisas podem ser feitas voltadas a eliminação destes produtos de maior toxicidade do efluente.

Tabela 11 – Toxicidade crônica e aguda do E1 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub>, UV/O<sub>3</sub>.

N.I.	Peixe 96h-LC50 (mg/L)	<i>Daphnia</i> 48h- LC50 (mg/L)	Algas Verdes 96h- EC50 (mg/L)	Peixe ChV (mg/L)	<i>Daphnia</i> ChV (mg/L)	Algas Verdes ChV (mg/L)	UV	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,	UV/TiO <sub>2</sub>	UV/O <sub>3</sub>
1	178761,39	84237,15	29028,22	14023,79	4889,46	5018,87		X		X
2	721,19	2849,29	142,13	4025,23	759,98	1298,54				X
3	9485,54	5074,64	2955,27	864,3	419,32	677,82	X	X	X	X
4	4699,56	2599,52	1737,82	445,4	235,7	429,34			X	X
5	4,76	26,15	3,16	2,29	9,27	0,48		X	X	X
6	11,81	83,06	5,43	6,24	30,56	0,76			X	
7	41,33	418,58	11,03	25,1	162,8	1,34			X	X
8	1599,47	962,67	605,22	417,48	157,57	223,19			X	
9	20,06	10,49	1,79	2,07	1,23	4,21	X	X	X	
10	11326,27	5977,89	3291,68	1015,66	475,68	732,55			X	
11	4,16	22,33	2,86	1,98	7,89	0,44	X	X	X	X
12	114,9	74,51	96,15	13,14	10,52	33,85	X	X	X	
13 (E1)	3,82	3,16	0,36	0,44	0,44	1,06	X	X	X	X
14	9,83	28,62	0,92	5,98	2,28	6,79	X			X
15	27,78	13,44	2,47	2,82	1,54	5,55	X	X	X	X

 Muito tóxico
  Tóxico
  Prejudicial
  Não prejudicial

Nota: N.I. = número de identificação dos subproduto do E1.

#### 4.4.2 Toxicidade do E2 e seus subprodutos

A Tabela 12 apresenta os valores das toxicidades crônica e aguda do E2 e de seus subprodutos. O E2 apresentou toxicidade aguda e crônica forte ou muito forte todos os organismos avaliados (algas verdes, peixes e *Daphnia*). Novamente, as algas verdes, em tratamento crônico, foram a espécie mais afetada pelos subprodutos. O tratamento UV/TiO<sub>2</sub> mostrou-se como o mais tóxico, pois apresentou predominante produtos de maior ecotoxicidade, principalmente em relação a toxicidade crônica da espécie algas verdes. O tratamento com UV/O<sub>3</sub> pode ser

considerado menos prejudicial, pois teve, em sua maioria, produtos enquadrados como não tóxicos. Entretanto, como pode ser visto na Tabela 12, todos os tratamentos aplicados apresentaram subprodutos enquadrados como muito tóxicos.

Tabela 12 – Toxicidade crônica e aguda do E2 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub>, UV/O<sub>3</sub>.

N.I.	Peixe 96h-LC50 (mg/L)	<i>Daphnia</i> 48h- LC50 (mg/L)	Algas Verdes 96h-EC50 (mg/L)	Peixe ChV (mg/L)	<i>Daphnia</i> ChV (mg/L)	Algas Verdes ChV (mg/L)	UV	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	UV/TiO <sub>2</sub>	UV/O <sub>3</sub>
1	392,32	1393,99	59,7	1014,2	244,42	506,41				X
2	62459,1	30855,52	12925,27	5180,56	2042,5	2482,52				X
3	2,08	9,1	1,93	0,92	3,12	0,32	X	X	X	X
4	2,38	10,65	2,14	1,06	3,66	0,35			X	
5	11,81	83,06	5,43	6,24	30,56	0,76				X
6 (E2)	1,71	1,78	0,16	0,21	0,27	0,55	X	X	X	X
7	300979,2	138928,75	43954,45	23043,19	7613,31	7257,76		X		
8	139,397	66331,32	23798,19	11062,18	3956,04	4204,94		X		X
9	1405900	604696,62	142865,6	99033,19	27224,25	20156,8	X	X	X	X

Nota: N.I. = número de identificação dos subprodutos do E2.

	Muito tóxico		Tóxico		Prejudicial		Não prejudicial
---	--------------	---	--------	---	-------------	--	-----------------

#### 4.4.3 Toxicidade do EE2 e seus subprodutos

A Tabela 13 apresenta os valores das toxicidades crônica e aguda do EE2 e de seus subprodutos. O EE2 apresentou toxicidade aguda e crônica, forte ou muito forte, para todos os organismos avaliados (algas verdes, peixes e *Daphnia*). Os subprodutos de EE2 apresentaram diferentes níveis de toxicidade para as diferentes espécies, sendo o peixe a espécie mais sensível para o EE2 e seus subprodutos. O tratamento UV/O<sub>3</sub> apresentou predominantemente produtos de menor toxicidade que o composto parental e também produtos não prejudiciais aos organismos testados. No entanto, os tratamentos de UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/TiO<sub>2</sub> apresentaram em sua maioria produtos enquadrados como tóxicos e muito tóxicos em relação a toxicidade crônica para a espécie.



Tabela 13 – Toxicidade crônica e aguda do EE2 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub>, UV/O<sub>3</sub>.

N.I.	Peixe 96h-LC50 (mg/L)	Daphnia 48h-LC50 (mg/L)	Algas Verdes 96h-EC50 (mg/L)	Peixes ChV (mg/L)	Daphnia ChV (mg/L)	Algas Verdes ChV (mg/L)	UV	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	UV/TiO <sub>2</sub>	UV/O <sub>3</sub>
1	55,75	208,1	9,57	206,06	44,34	83,99				x
2	24700,12	19987,57	11394,39	2510,95	1707,77	8006,96				x
3	62459,1	30855,52	12925,27	5180,56	2042,5	2482,52				x
4	2,08	9,1	1,93	0,92	3,12	0,32	x			
5	4,23	896,53	545,22	0,12	71,32	96,6				x
6	2425,88	2295,23	1314,26	169,7	168,95	842,02				x
7	1642,52	952,47	774,03	164,59	98,49	212,43			x	
8	130,179	129,59	74,3	8,19	9,13	46,32				x
9	49,43	52,08	29,91	2,67	3,46	17,98	x	x	x	x
10	4,08	474,92	328,09	0,09	40,95	66,03	x	x	x	
11	4,3	980,78	587,19	0,12	77,25	102,42			x	
12	70,9	72,79	41,78	4,08	4,96	25,5			x	
13	1405,57	1385,67	794,37	89,12	98,08	496,72			x	
14 (EE2)	7,45	8,93	5,15	0,3	0,52	2,87	x	x	x	x
15	17,14	19,45	11,19	0,78	1,2	6,44	x	x	x	x
16	4,08	474,92	328,09	0,09	40,95	66,03	x	x		x
17	5,18	13,28	0,36	1,26	0,64	2,41			x	
18	1,23	3,17	0,56	0,82	1,46	0,23	x	x		x
19	1405900,3	604696,62	142865,62	99033,19	27224,25	20156,83	x			x
20	3439,07	3137,47	1794,68	262,47	239,11	1174,84		x	x	

Nota: N.I. = número de identificação dos subprodutos do EE2.

 Muito tóxico
  Tóxico
  Prejudicial
  Não prejudicial

#### 4.4.4 Toxicidade do E3 e seus subprodutos

A Tabela 14 apresenta os valores das toxicidades crônica e aguda do E3 e de seus subprodutos. O E3 apresentou pelo menos em um parâmetro de toxicidade (aguda ou crônica) elevada ou muito alta para todos os organismos avaliados (algas verdes, peixes e *Daphnia*). Novamente, as algas verdes foram a espécie mais

afetada nos testes agudo e crônico com os produtos. O tratamento UV/TiO<sub>2</sub> mostrou-se como o mais tóxico, pois apresentou predominante subprodutos tóxicos, principalmente devido a toxicidade crônica da espécie algas verdes. No entanto, os demais tratamentos, com UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub>, tiveram em sua maioria produtos enquadrados como não tóxicos. Além do mais, os subprodutos apresentaram menor potencial tóxico que o poluente parental em relação a toxicidade aguda (EC50) das algas verdes e crônica da *Daphnia*.

Tabela 14 – Toxicidade crônica e aguda do E3 e seus subprodutos nos tratamentos de UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub>, UV/O<sub>3</sub>.

N.I.	Peixe 96h-LC50 (mg/L)	<i>Daphnia</i> 48h-LC50 (mg/L)	Algas Verdes 96h-EC50 (mg/L)	Peixe ChV (mg/L)	<i>Daphnia</i> ChV (mg/L)	Algas Verdes ChV (mg/L)	UV	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	UV/TiO <sub>2</sub>	UV/O <sub>3</sub>
1	102,28	1325,59	18,88	68,26	535,31	2,1			X	X
2	11,81	83,06	5,43	6,24	30,56	0,76		X	X	
3	10,36	71,15	4,93	5,42	26,08	0,69		X	X	
4 (E3)	10,88	6,8	0,99	1,17	0,86	2,54	X	X	X	X
5	97,94	33,14	8,45	9,18	3,3	15,74			X	
6	136589,36	64527,02	22469,05	10747,31	3771,77	3906,68		X		X
7	88474,96	42724,88	16291,13	7144,16	2654,75	2974,47	X	X		
8	6	29,49	2,96	31,33	42,84	0,97	X	X	X	X
9	5,61	11097,3	4192,85	0,33	653,06	461,53			X	
10	1148,86	4876,43	269,68	10789,32	1727,17	2590,61	X	X	X	X
11	36250,03	18313,43	8415,56	3087,16	1290,22	1698,99		X	X	
12	354364,52	132235,40	1736551,75	2111130,75	400951,44	178571,56				X
13	367,71	227,51	241,72	39,77	28,18	76,64				X

Nota: N.I. = número de identificação dos subprodutos do E3.

 Muito tóxico    Tóxico    Prejudicial    Não prejudicial

#### 4.4.5 Toxicidade da mistura de E1, E2, EE2, E3 e seus subprodutos

A Figura 16 mostra os valores de toxicidade aguda monitorada com o ensaio *Vibrio Fisheri* no tempo de 30 minutos de cada reação. A toxicidade da matriz

contendo  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cada estrógeno, antes do tratamento, causou um efeito inibitório de aproximadamente 29,1 Uts (Unidades Tóxicas), após 30 minutos de exposição. Obteve-se maior percentual de efeito inibitório com os tratamentos realizados, sendo: UV (30,95 UTs), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (32,4 UTs), UV/O<sub>3</sub> (50,24 UTs) e UV/TiO<sub>2</sub> (73,72UTs). No entanto, pode-se observar que os tratamentos de fotólise e foto-peroxidação apresentaram unidades tóxicas inferiores aos tratamentos com UV e ozônio ou dióxido de titânio.

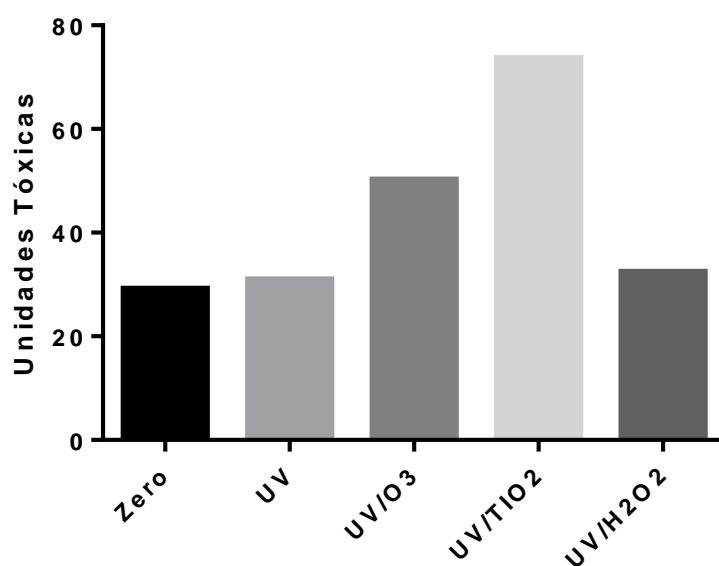


Figura 15 – Toxicidade nas reações com a mistura de E1, E2, EE2 e E3 com POAs após 30 minutos.

## 5 CONCLUSÃO

A primeira etapa deste estudo consistiu em quantificar os hormônios E1, E2, EE2 e E3 nas águas do Rio Marmeleiro – PR, pertencente a uma bacia hidrográfica onde predominam atividades agrícolas e agropecuárias, e nas águas do Rio Cubatão – SC, uma bacia hidrográfica intensamente urbanizada e com atividades industriais. Foi detectada presença dos hormônios em ambos os rios, indicando que independente do uso e ocupação do solo a contaminação dos corpos hídricos por hormônios pode ocorrer. Isto porque, estes compostos são liberados diariamente pelos seres humanos e mamíferos. Além de serem persistentes aos tratamentos convencionais aplicados nas Estações de Tratamento de Esgoto. A presença de concentrações baixas de E1, E2, EE2 e E3 em rios representa um risco para o meio ambiente, especialmente porque os seus efeitos sinérgicos e, de longo prazo, ainda não são totalmente compreendidos.

Neste sentido, na segunda etapa deste estudo, amostras de água do Rio Cubatão foram utilizadas para investigar formas de tratamento dos hormônios. A fotólise (UV), foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fotocatalise (UV/TiO<sub>2</sub>) e foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>) foram efetivas na remoção de todos os hormônios deste estudo. Nestes tratamentos, suas constantes cinéticas se ajustaram bem a cinética de pseudo-primeira ordem, sendo:  $k_{UV/O_3} > k_{UV/TiO_2} > k_{UV/H_2O_2} > k_{UV}$ . Comparando os valores das constantes cinéticas de cada hormônio, maiores taxas foram encontradas para E1 e menores para E3, sugerindo a seguinte ordem decrescente de degradação: E1 > E2 > EE2 > E3.

Em relação aos produtos de transformação gerados nos tratamentos aplicados e identificados neste estudo, estes foram predominantemente oriundos de adição de radical hidroxil e abertura do anel aromático. De acordo com os produtos detectados, o mecanismo de degradação sugerido foi por ataque direto de radicais hidroxila. Grande parte dos subprodutos foi unicamente encontrado neste estudo. Também, alguns produtos reportados em estudos anteriores com POAs foram feitos em água ultrapura ou em outra matriz sintética e, neste estudo, puderam ser confirmados em reações com água do rio. Desta forma, este trabalho contribuiu para ampliar e confirmar as possíveis estruturas geradas em reações com POAs em águas superficiais.

A estimativa da toxicidade dos subprodutos e dos hormônios mostrou que os subprodutos do E1, E2 e E3 foram muito tóxicos para a espécie algas verdes. Enquanto, a toxicidade dos produtos resultantes da degradação do EE2 demonstraram ser muito tóxicos para a espécie peixes. Desta forma, as algas verdes e os peixes seriam os bioindicadores mais adequados para avaliar a toxicidade destes compostos. Em relação a toxicidade dos tratamentos aplicados, a análise feita com as bactérias *Vibrio fisheri* mostrou que o tratamento de fotocatalise UV/TiO<sub>2</sub> foi o mais tóxico para as bactérias. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos pelo programa ECOSAR que indicou o tratamento UV/TiO<sub>2</sub> ser o mais tóxico para E1, E2, EE2 e E3.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, M. et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 626, p. 1295–1309, 2018.

ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**, v. 99, p. 107–119, 2017.

AHMED, M. B. et al. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 274–298, 2017.

BILA, D. et al. Estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol by ozonation and identification of by-products. **Chemosphere**, v. 69, n. 5, p. 736–746, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BERGAMASCO, Ana Marcela Di Dea et al. Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 11, p. 3288-3293, 2011.

BLOOM, M. S.; MICU, R.; NEAMTIU, I. Female Infertility and “Emerging” Organic Pollutants of Concern. **Current Epidemiology Reports**, v. 3, n. 1, p. 39–50, 2016.

BOWDEN, J. A. et al. Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 27, p. 3237–3242, 2009.

BURDEN, N. et al. The utility of QSARs in predicting acute fish toxicity of pesticide metabolites : A retrospective validation approach. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 241–246, 2016.

CABAN, M. et al. Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta$ -agonists in

environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 117–127, 2012.

CABAN, M. et al. Determination of pharmaceutical residues in drinking water in Poland using a new SPE-GC-MS(SIM) method based on Speedisk extraction disks and DIMETRIS derivatization. **Science of the Total Environment**, v. 538, p. 402–411, 2015.

CALDWELL, D. J. et al. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1396–1406, 2012.

CAUPOS, E.; MAZELLIER, P.; CROUE, J. Photodegradation of estrone enhanced by dissolved organic matter under simulated sunlight. **Water Research**, v. 45, n. 11, p. 3341–3350, 2011.

CÉDAT, B. et al. Are UV photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. **Water Research**, v. 100, p. 357–366, 2016.

CHEN, H.; KUO, H.; DING, W. Chemosphere Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography – tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. **Chemosphere**, v. 74, n. 4, p. 508–514, 2009.

CHEN, Y.; ZHANG, K.; ZUO, Y. Direct and indirect photodegradation of estriol in the presence of humic acid, nitrate and iron complexes in water solutions. **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 802–809, 2013.

CHOW, C.; LEUNG, K. S. Chemosphere Removing acesulfame with the peroxone process : Transformation products , pathways and toxicity. **Chemosphere**, v. 221, p. 647–655, 2019.

CHOWDHURY, R. R.; CHARPENTIER, P. A.; RAY, M. B. Photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 219, n. 1, p. 67–75, 2011.

CUI, C. W.; JI, S. L.; REN, H. Y. Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory. **Environmental**

**Monitoring and Assessment**, v. 121, n. 1–3, p. 407–417, 2006.

DALLEGRAVE. Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS. p. 112, 2012.

DÍAZ, M. et al. Visible-light-mediated photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol: Kinetics, mechanism and photoproducts. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 202, n. 2–3, p. 221–227, 2009.

ESPLUGAS, S. et al. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 3, p. 631–642, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 Establishing a Watch List of Substances for Union-wide Monitoring in the Field of Water Policy Pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and Repealing Comm. v. notified u, 2018.

FANG, T. Y. et al. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. **Chemosphere**, v. 165, p. 358–368, 2016.

FATTA-KASSINOS, D.; VASQUEZ, M. I.; KÜMMERER, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 693–709, 2011.

FERREIRA, M. G. M. F. Remoção da atividade estrogênica de 17-beta-estradiol e de 17-alfa-etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. p. 173, 2008.

FRONTISTIS, Z. et al. Fast degradation of estrogen hormones in environmental matrices by photo-Fenton oxidation under simulated solar radiation. **Chemical Engineering Journal**, v. 178, p. 175–182, 2011.

FRONTISTIS, Z. et al. Photocatalytic (UV-A/TiO<sub>2</sub>) degradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in environmental matrices: Experimental studies and artificial neural network modeling. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.



240, p. 33–41, 2012.

FRONTISTIS, Z. et al. UV and simulated solar photodegradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in secondary-treated wastewater by hydrogen peroxide or iron addition. **Catalysis Today**, v. 252, p. 84–92, 2015a.

FRONTISTIS, Z. et al. UV and simulated solar photodegradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in secondary-treated wastewater by hydrogen peroxide or iron addition. **Catalysis Today**, v. 252, p. 84–92, 2015b.

GIBSON, D. A.; SAUNDERS, P. T. K. Endocrine disruption of oestrogen action and female reproductive tract cancers. **Endocrine-Related Cancer**, v. 21, n. 2, p. 13–31, 2014.

GIULIVO, M. et al. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. **Environmental Research**, v. 151, p. 251–264, 2016.

GLAZE, W. H.; KANG, J. W.; CHAPIN, D. H. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. **Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association**, v. 9, n. 9, p. 335–352, 1987.

GMUREK, M.; OLAK-KUCHARCZYK, M.; LEDAKOWICZ, S. Photochemical decomposition of endocrine disrupting compounds – A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 310, n. June, p. 437–456, 2017.

GROS, M. et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**, v. 36, n. 1, p. 15–26, 2010.

GROVER, D. P. et al. A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 1204–1210, 2009.

GRZYBOWSKI, W.; SZYDŁOWSKI, J. The impact of chromophoric dissolved organic matter on the photodegradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in natural waters. **Chemosphere**, v. 111, p. 13–17, 2014.

GUEDES MANIERO, M.; MAIA BILA, D.; DEZOTTI, M. Degradation and

estrogenic activity removal of  $17\beta$ -estradiol and  $17\alpha$ -ethinylestradiol by ozonation and  $O_3/H_2O_2$ . **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 1, p. 105–115, 2008.

HAKK, H.; SIKORA, L.; CASEY, F. X. M. Fate of estrone in laboratory-scale constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v. 111, n. October 2017, p. 60–68, 2018.

HANSELMAN, T. A.; GRAETZ, D. A.; WILKIE, A. C. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 24, p. 5471–5478, 2003.

HANSEN, K. M. S.; ANDERSEN, H. R. Energy Effectiveness of Direct UV and UV /  $H_2O_2$  Treatment of Estrogenic Chemicals in Biologically Treated Sewage. v. 2012, 2012.

HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices e A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 10, p. 2304–2347, 2011.

HUBER, M. M.; TERNES, T. A.; VON GUNTEN, U. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of  $17\alpha$ -ethinylestradiol. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 19, p. 5177–5186, 2004.

IKEHATA, K.; EL-DIN, M. G.; SNYDER, S. A. Ozonation and advanced oxidation treatment of emerging organic pollutants in water and wastewater. **Ozone: Science and Engineering**, v. 30, n. 1, p. 21–26, 2008.

IKEHATA, K.; JODEIRI NAGHASHKAR, N.; GAMAL EL-DIN, M. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, n. 6, p. 353–414, 2006.

IRMAK, S.; ERBATUR, O.; AKGERMAN, A. Degradation of  $17\beta$ -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 126, n. 1–3, p. 54–62, 2005.

JARDIM, W. F. et al. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3–8, 2012.

JASSO-SALCEDO, A. B. et al. Modeling and optimization of a photocatalytic

process: Degradation of endocrine disruptor compounds by Ag/ZnO. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 128, p. 174–191, 2017.

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. **Science of the Total Environment**, v. 256, n. 2–3, p. 163–173, 2000.

KEEN, O. S. et al. Dimer formation during UV photolysis of diclofenac. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1948–1956, 2013.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 402–417, 2009.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009.

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997–1003, 2009.

LARCHER, S. et al. Degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by ozonation - Identification of the by-products and assessment of their estrogenicity and toxicity. **Environment International**, v. 39, n. 1, p. 66–72, 2012.

LAURENSEN, J. P. et al. Ethinyl Estradiol and Other Human Pharmaceutical Estrogens in the Aquatic Environment: A Review of Recent Risk Assessment Data. **The AAPS Journal**, v. 16, n. 2, p. 299–310, 2014.

LEE, Y.; VON GUNTEN, U. Transformation of 17 $\beta$ -ethinylestradiol during water chlorination: Effects of bromide on kinetics, products, and transformation pathways. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 480–487, 2009.

LEECH, D. M.; SNYDER, M. T.; WETZEL, R. G. Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 $\beta$ -estradiol in water. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2087–2092, 2009.

LI, C. et al. Kinetics and mechanism of 17 $\beta$ -estradiol chlorination in a pilot-scale water distribution systems. **Chemosphere**, v. 178, p. 73–79, 2017.

LI, Y.; ZHANG, A. Removal of steroid estrogens from waste activated sludge using Fenton oxidation: Influencing factors and degradation intermediates. **Chemosphere**, v. 105, p. 24–30, 2014.

LINDEN, K. G.; MOHSENI, M. **Advanced Oxidation Processes: Applications in Drinking Water Treatment**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2013. v. 2

LIU, R.; ZHOU, J. L.; WILDING, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, n. 1–2, p. 179–189, 2004.

LIU, Y. et al. Photodegradation behaviors of 17 $\beta$ -estradiol in different water matrixes. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 112, p. 335–341, 2017.

LIU, Z. HUA; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 2, p. 731–748, 2009.

LOCATELLI, M. et al. Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 1–18, 2016.

MA, L.; YATES, S. R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 529–542, 2018.

MAI, J. et al. Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of 17 $\beta$ -estradiol in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 73, n. 4, p. 600–606, 2008.

MANICKUM, T.; JOHN, W. Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa). **Science of the Total Environment**, v. 468–469, p. 584–597, 2014.

MAZELLIER, P.; MÉITÉ, L.; DE LAAT, J. Photodegradation of the steroid hormones 17 $\beta$ -estradiol (E2) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous

solution. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1216–1223, 2008.

MBOULA, V. M. et al. Photocatalytic degradation of estradiol under simulated solar light and assessment of estrogenic activity. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 162, p. 437–444, 2015.

MELO, S. A. S. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009.

MIERZWA, C.; RODRIGUES, R.; TEIXEIRA, A. C. S. C. **UV-Hydrogen Peroxide Processes**. [s.l.: s.n.].

MOHAGHEGHIAN, A. et al. Distribution of estrogenic steroids in municipal wastewater treatment plants in Tehran, Iran. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2014.

MOREIRA, D. S. et al. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental Technology**, v. 30, n. 10, p. 1041–1049, 2009.

NASUHOGLU, D.; BERK, D.; YARGEAU, V. Photocatalytic removal of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) and levonorgestrel (LNG) from contraceptive pill manufacturing plant wastewater under UVC radiation. **Chemical Engineering Journal**, v. 185–186, p. 52–60, 2012.

NAZARI, E.; SUJA, F. Effects of 17  $\beta$  -estradiol ( E2 ) on aqueous organisms and its treatment problem : a review. v. 31, n. 4, p. 465–491, 2016.

OHTANI, B. Photocatalysis A to Z-What we know and what we do not know in a scientific sense. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 157–178, 2010.

PACAKOVA, V. et al. Analysis for estrogens as environmental pollutants - A review. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 5–6, p. 867–882, 2009.

PEREIRA, R. DE O. et al. Identification of new ozonation disinfection byproducts of 17 $\beta$ -estradiol and estrone in water. **Chemosphere**, v. 84, n. 11, p. 1535–1541, 2011.

PEREIRA, V. J. et al. Integration of nanofiltration, UV photolysis, and

advanced oxidation processes for the removal of hormones from surface water sources. **Separation and Purification Technology**, v. 95, p. 89–96, 2012.

PESSOA, G. P. et al. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288–295, 2014.

REN, D. et al. ScienceDirect Photodegradation of 17  $\alpha$ -ethynylestradiol in dissolved humic substances solution: Kinetics, mechanism and estrogenicity variation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 54, p. 196–205, 2016.

REN, D. et al. Photodegradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in dissolved humic substances solution: Kinetics, mechanism and estrogenicity variation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 54, p. 196–205, 2017.

REN, D. et al. Different response of 17  $\beta$ -ethynylestradiol photodegradation induced by aquatic humic and fulvic acids to typical water matrixes. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 121, p. 367–373, 2019.

REUNGOAT, J. et al. Ozonation and biological activated carbon filtration of wastewater treatment plant effluents. **Water Research**, v. 46, n. 3, p. 863–872, 2012.

RIBEIRO, A. R. et al. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. **Environment International**, v. 75, p. 33–51, 2015.

RIBEIRO, A. R. et al. Impact of water matrix on the removal of micropollutants by advanced oxidation technologies. **Chemical Engineering Journal**, 2019.

ROKHINA, E. V. et al. Ozonation of a mixture of estrogens and progestins in aqueous solution: Interpretation of experimental results by computational methods. **Chemosphere**, v. 89, n. 11, p. 1323–1329, 2012.

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, n. 20, p. 5476–5483, 2004.

SARKAR, S. et al. Degradation of estrone in water and wastewater by various advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 16–24, 2014.

SEGMULLER, B. E. et al. Identification of autoxidation and photodegradation products of ethynylestradiol by on-line HPLC-NMR and HPLC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 5, p. 927–937, 2000.

SHEIKH, I. A. et al. Computational insights into the molecular interactions of environmental xenoestrogens 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol, bisphenol A (BPA), and BPA metabolite, 4-methyl-2, 4-bis (4-hydroxyphenyl) pent-1-ene (MBP) with human sex hormone-binding globulin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, n. October 2016, p. 284–291, 2017.

SIEVERS, M. 4.13 – Advanced Oxidation Processes. **Treatise on Water Science**, p. 377–408, 2011.

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

SIRTORI, C. et al. Effect of water-matrix composition on Trimethoprim solar photodegradation kinetics and pathways. **Water Research**, v. 44, n. 9, p. 2735–2744, 2010.

SORNALINGAM, K. et al. Photocatalysis of estrone in water and wastewater: Comparison between Au-TiO<sub>2</sub>nanocomposite and TiO<sub>2</sub>, and degradation by-products. **Science of the Total Environment**, v. 610–611, p. 521–530, 2018.

SORNALINGAM, K.; MCDONAGH, A.; ZHOU, J. L. Photodegradation of estrogenic endocrine disrupting steroidal hormones in aqueous systems: Progress and future challenges. **Science of the Total Environment**, v. 550, p. 209–224, 2016a.

SORNALINGAM, K.; MCDONAGH, A.; ZHOU, J. L. Photodegradation of estrogenic endocrine disrupting steroidal hormones in aqueous systems: Progress and future challenges. **Science of The Total Environment**, v. 550, p. 209–224, 15 abr. 2016b.

SOUISSI, Y. et al. Estrone direct photolysis: By-product identification using LC-Q-TOF. **Chemosphere**, v. 87, n. 2, p. 185–193, 2012.

SUN, W. et al. Initial photocatalytic degradation intermediates/pathways of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol: Effect of pH and methanol. **Chemosphere**, v. 81, n. 1, p. 92–99, 2010.

SURUJLAL-NAICKER, S.; GUPTA, S. K.; BUX, F. Human and Ecological Risk Assessment: Evaluating the Acute Toxicity of Estrogen Hormones and Wastewater Effluents Using *Vibrio fischeri*. n. June 2015, p. 37–41, 2014.

TRUDEAU, V. L. et al. Lumiestrone is photochemically derived from estrone and may be released to the environment without detection. **Frontiers in Endocrinology**, v. 2, n. DEC, p. 1–13, 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Ecological Structure Activity Relationships ( ECOSAR ) Predictive Model. <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/ecological-structure-activity-relationships-ecosar-predictive-model>, 2017.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837–1842, 2010.

VIEIRA, G. B. et al. CeO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> nanostructures enhance adsorption and photocatalytic degradation of organic compounds in aqueous suspension. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 353, p. 325–336, 2018.

VIEIRA, K. M.; NASCENTES, C. C.; AUGUSTI, R. Ozonation of ethinylestradiol in aqueous-methanolic solution: Direct monitoring by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 787–794, 2010.

VILELA, C. L. S.; BASSIN, J. P.; PEIXOTO, R. S. Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 546–559, 2018.

WANG, L. et al. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological



tools. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 1, p. 148–156, 2011.

WANG, M. et al. Chemosphere Photolysis of atorvastatin in aquatic environment: Influencing factors, products, and pathways. **Chemosphere**, v. 212, p. 467–475, 2018.

WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Endocrine disrupting compounds in drinking water supply system and human health risk implication. **Environment International**, n. May, p. 1–27, 2017.

WHIDBEY, C. M. et al. Photochemical induced changes of in vitro estrogenic activity of steroid hormones. **Water Research**, v. 46, n. 16, p. 5287–5296, 2012.

XU, H. et al. Recent advances in TiO<sub>2</sub>-based photocatalysis. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 32, p. 12642, 2014.

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

ZHANG, A.; LI, Y. Removal of phenolic endocrine disrupting compounds from waste activated sludge using UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>oxidation processes: Effects of reaction conditions and sludge matrix. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 307–323, 2014.

ZHANG, Y.; ZHOU, J. L.; NING, B. Photodegradation of estrone and 17β-estradiol in water. **Water Research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 2007.

ZHENG, W.; YATES, S. R.; BRADFORD, S. A. Analysis of steroid hormones in a typical airy waste disposal system. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 2, p. 530–535, 2008.

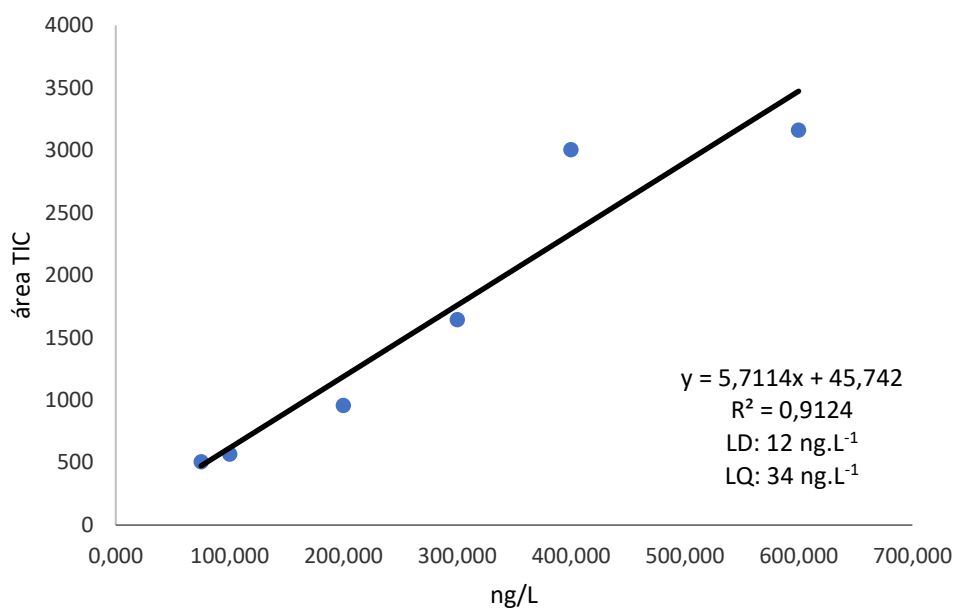
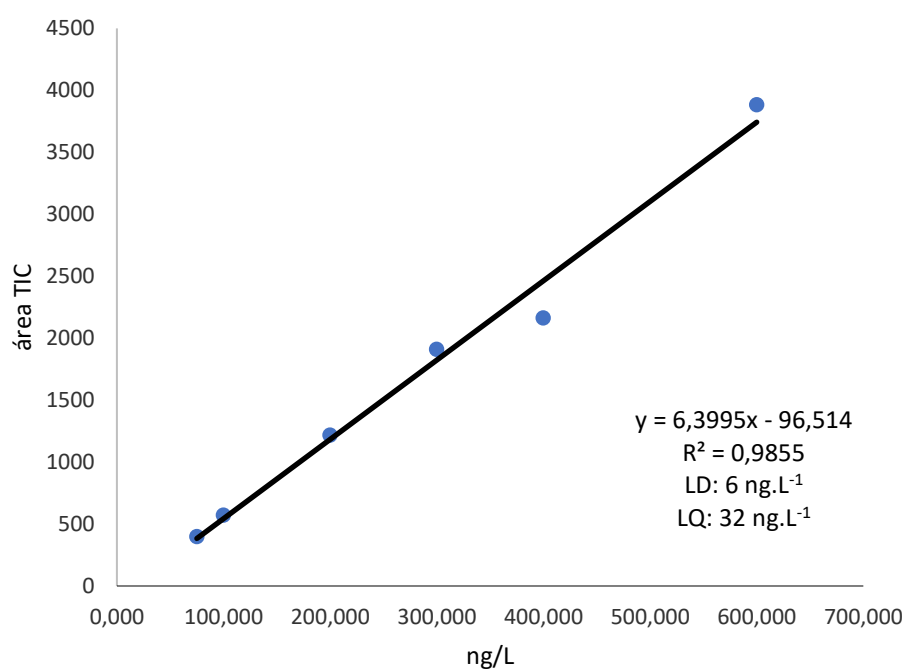
ZHOU, Y. et al. Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 3, p. 1719–1729, 2012.

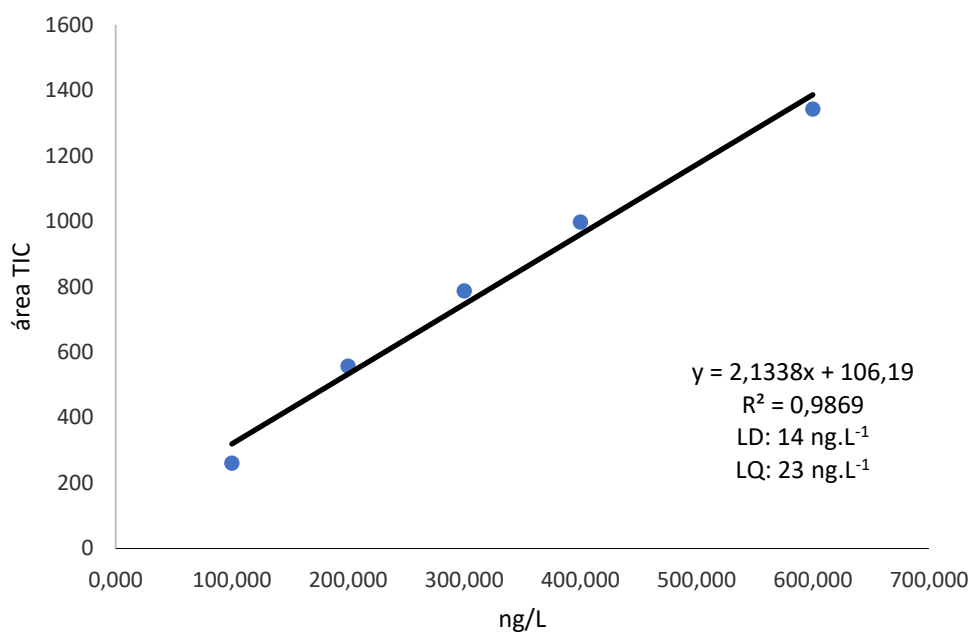
ZHOU, Y. et al. Oxidation of steroid estrogens by peroxymonosulfate (PMS) and effect of bromide and chloride ions: Kinetics, products, and modeling. **Water Research**, v. 138, p. 56–66, 2018.

## APÊNDICES

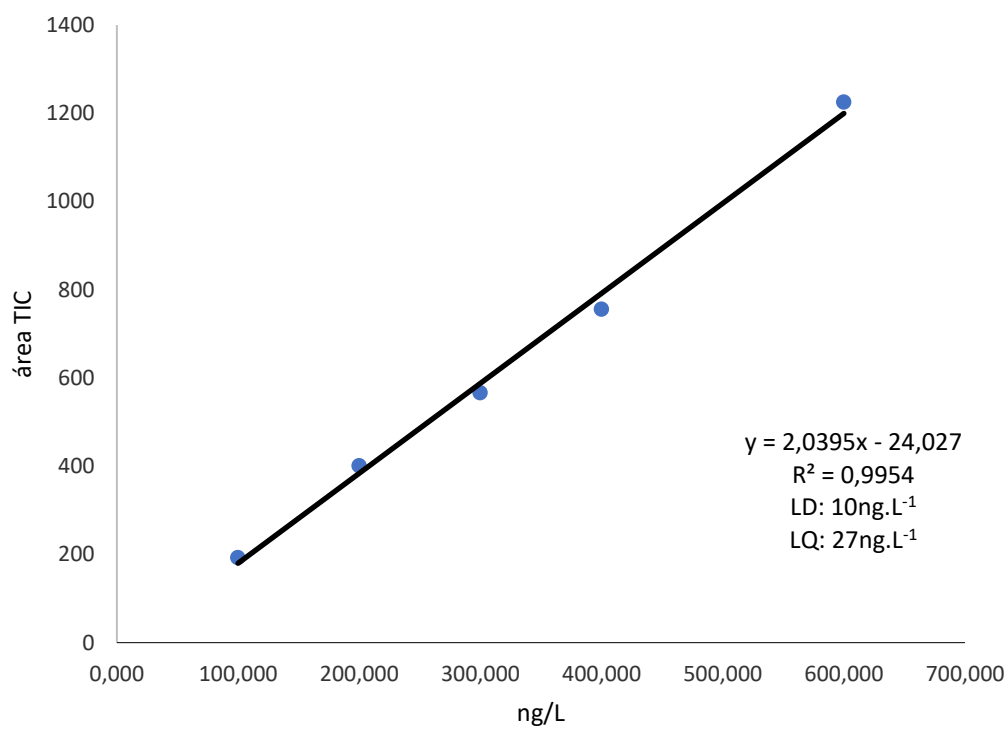
## APÊNDICE A – Curvas de calibração dos hormônios E1, E2, EE2 e E3.

Curva e calibração da estrona (E1) em água superficial.

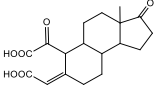
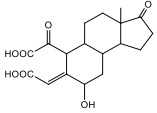
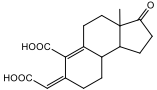
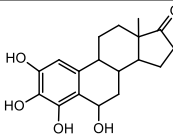
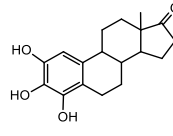
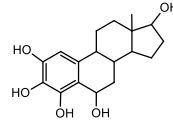
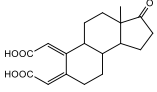
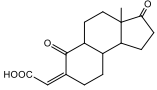
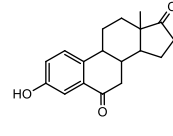
Curva de calibração do 17 $\beta$ -estradiol (E2) em água superficial.

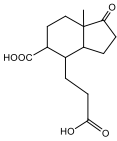
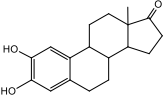
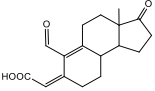
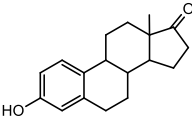
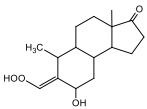
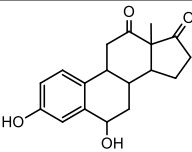
Curva de calibração do 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em água superficial.

Curva de calibração do estriol (E3) em água superficial

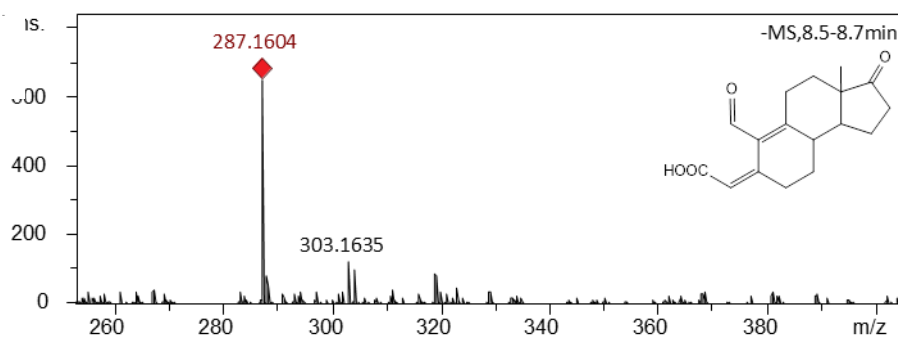
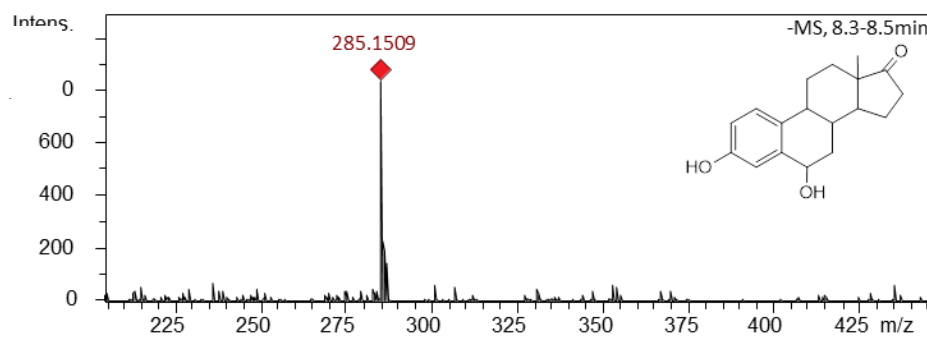
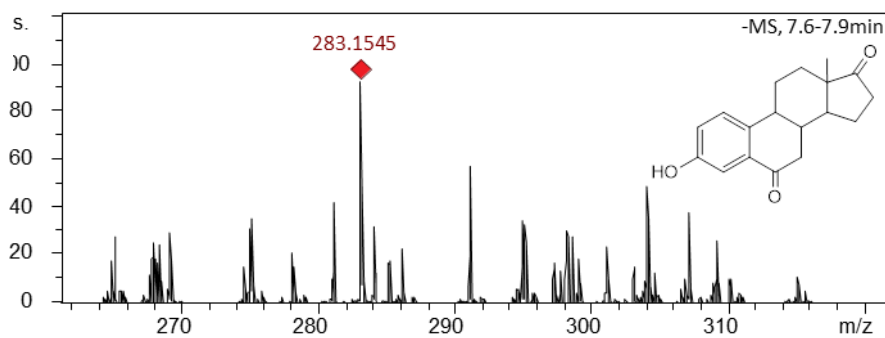
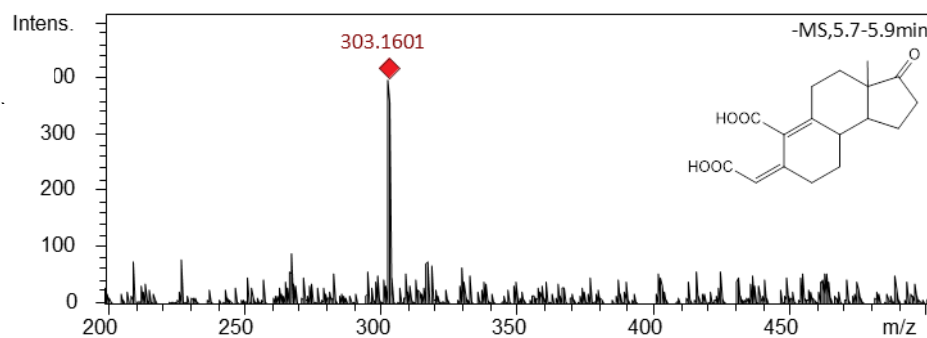


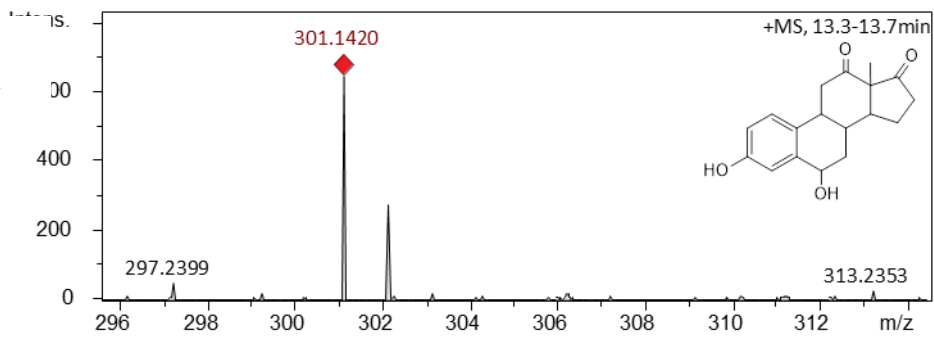
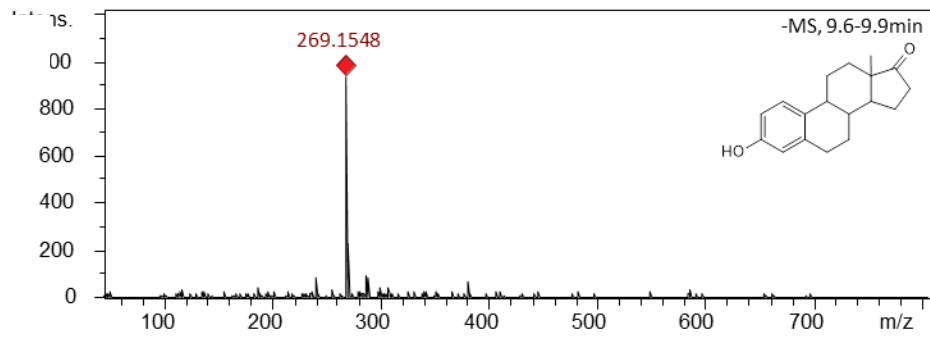
**APÊNDICE B** – Tabela dos produtos de transformação do E1 detectados nas reações UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub> identificados por HPLC/ESI-QTOFMS em modo positivo [M-H]<sup>+</sup> e negativo [M-H]<sup>-</sup>.

N.I.	TR	Fórmula		Estrutura	Reação	Referência
	(min)	Molecular	m/z	Proposta		
1	5.3	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	334		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
2	5.4	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	350		UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
3	5.7	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	304		Todas reações	Este estudo
4	6.8	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	318		UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	(SOUISSI et al., 2012)
5	6.9	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	302		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	(SOUISSI et al., 2012)
6	7.1	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	320		UV/TiO <sub>2</sub>	(SOUISSI et al., 2012)
7	7.1	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	318		UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
8	7.5	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	276		UV/TiO <sub>2</sub>	(SOUISSI et al., 2012)
9	7.6	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	284		UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub>	(SOUISSI et al., 2012)

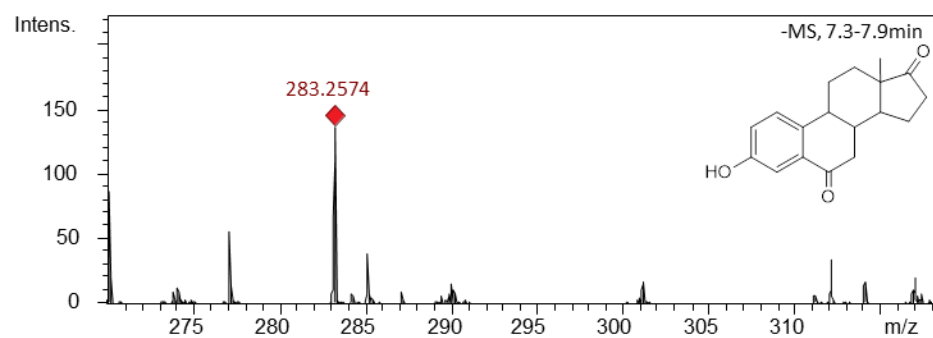
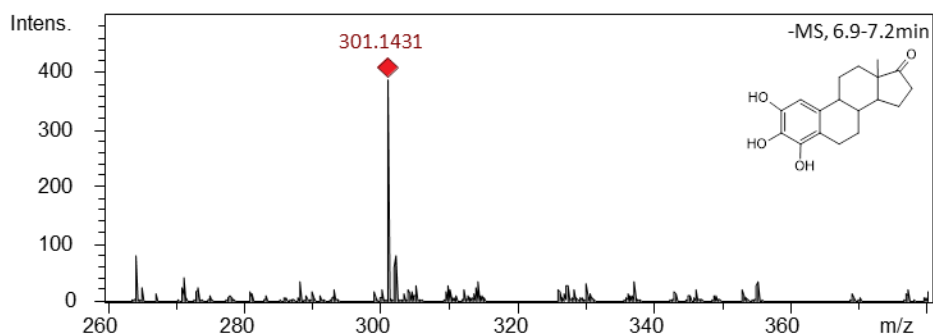
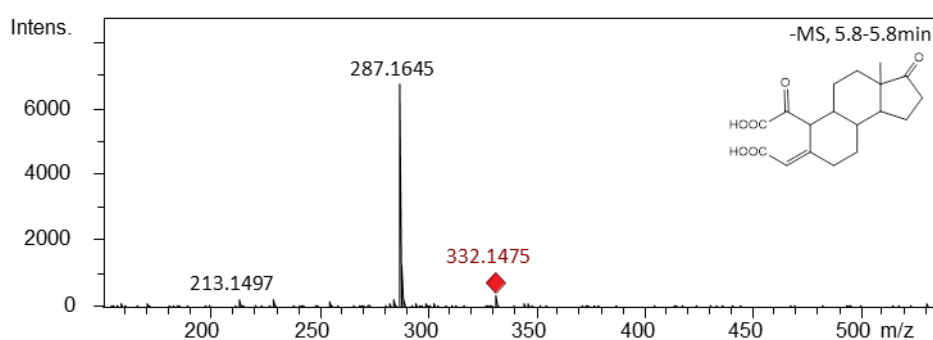
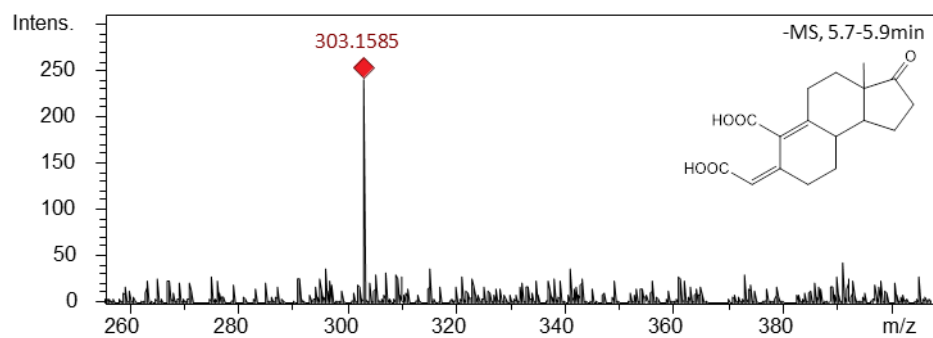
<b>10</b>	7.7	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	268		UV/TiO <sub>2</sub>	(HUBER; TERNES; VON GUNTEN, 2004; PEREIRA et al., 2011)
<b>11</b>	8.3	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	286		Todas reações	(HUBER; TERNES; VON GUNTEN, 2004; PEREIRA et al., 2011; SOUISSI et al., 2012)
<b>12</b>	8.7	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	288		UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub>	Este estudo
<b>13</b> <b>(E1)</b>	9.6	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270		Todas reações	-
<b>14</b>	10	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	280		UV, UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
<b>15</b>	13.5	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	300*		Todos	(SOUISSI et al., 2012)

Nota: N.I.= número de identificação; TR= tempo de retenção.

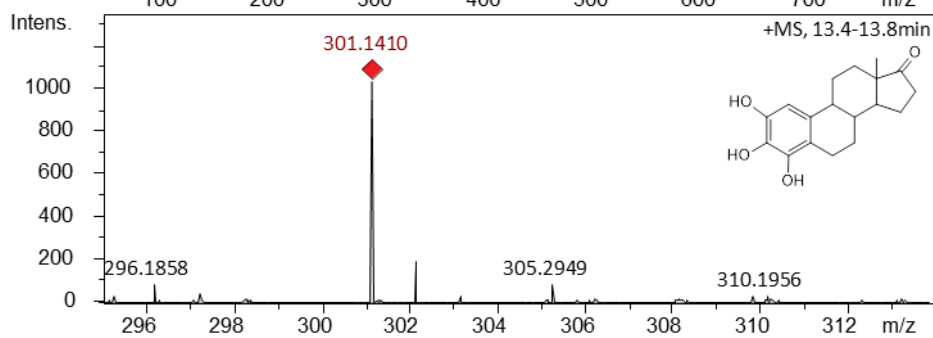
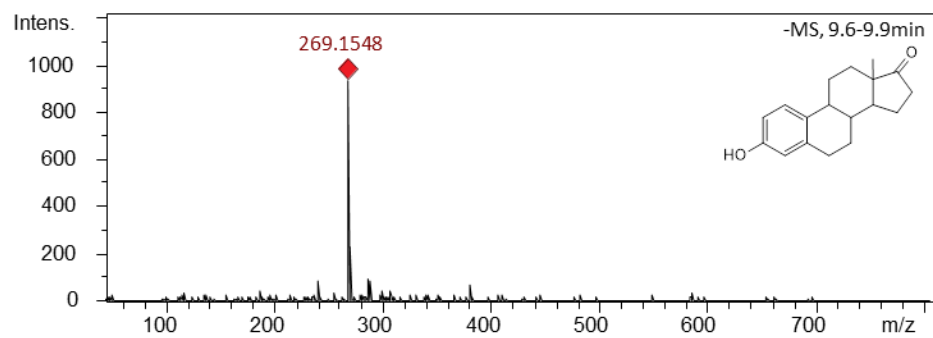
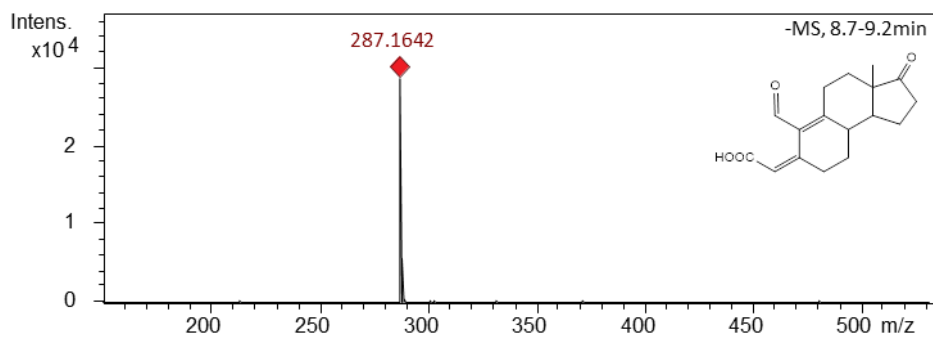
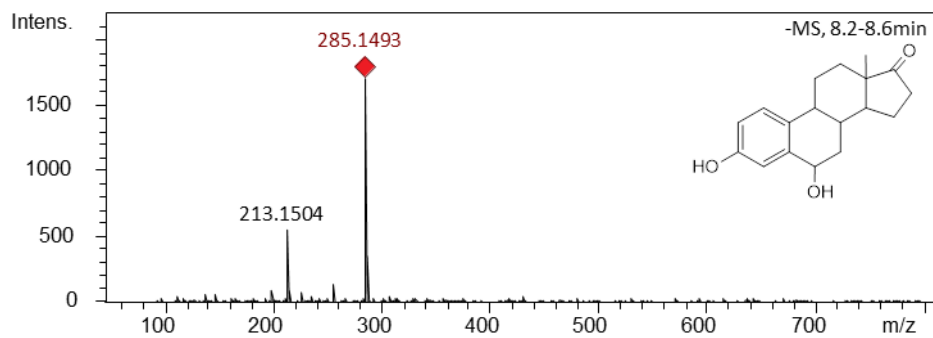
**APÊNDICE C – Espectros de Massa (MS) do E1 e seus subprodutos.****C.1 – Espectros de massa do E1 e seus subprodutos gerados na fotólise (UV).**



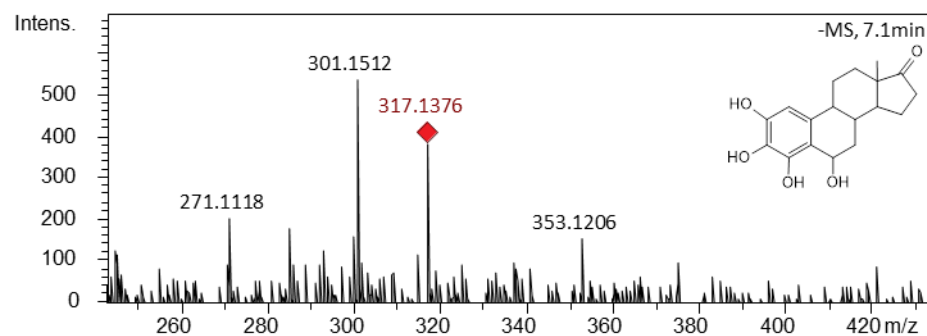
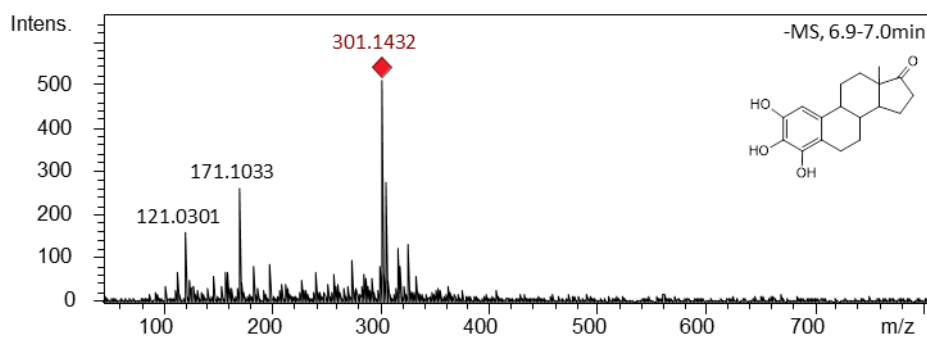
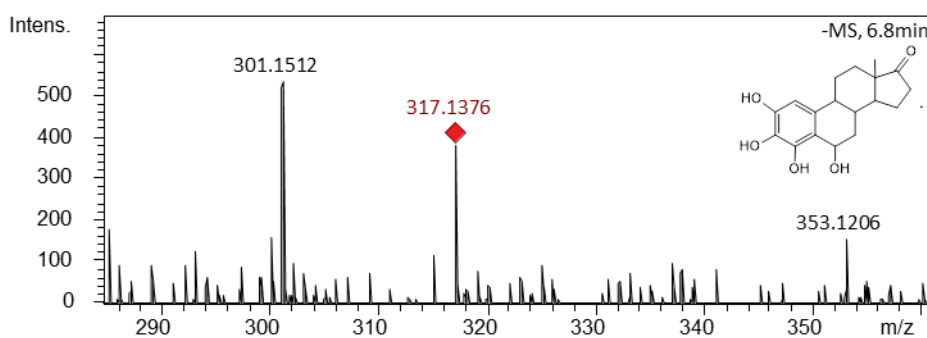
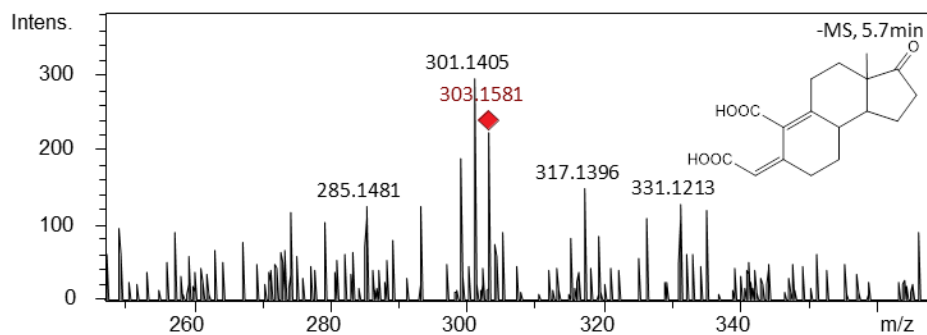
## C.2 – Espectros de massa do E1 e seus subprodutos gerados na foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

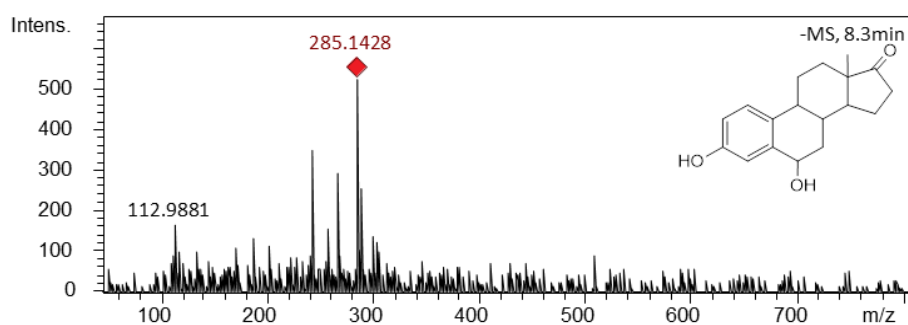
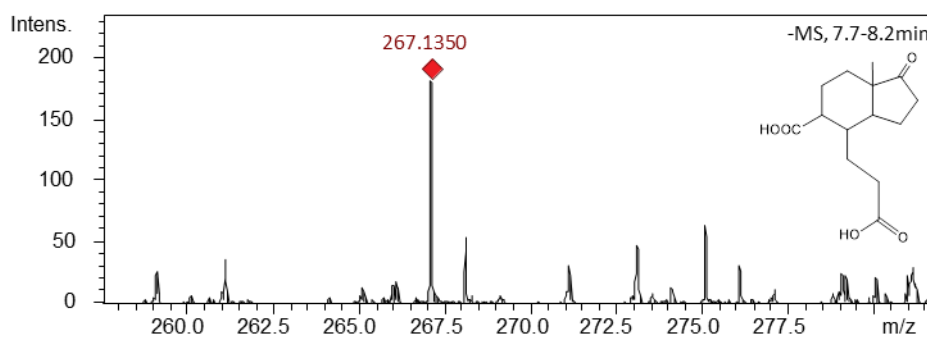
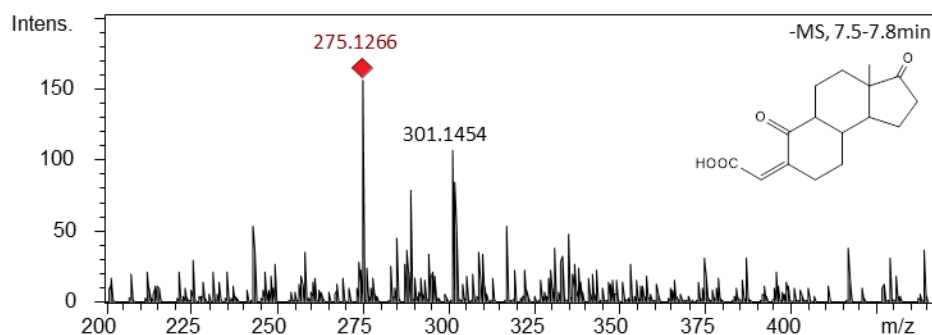
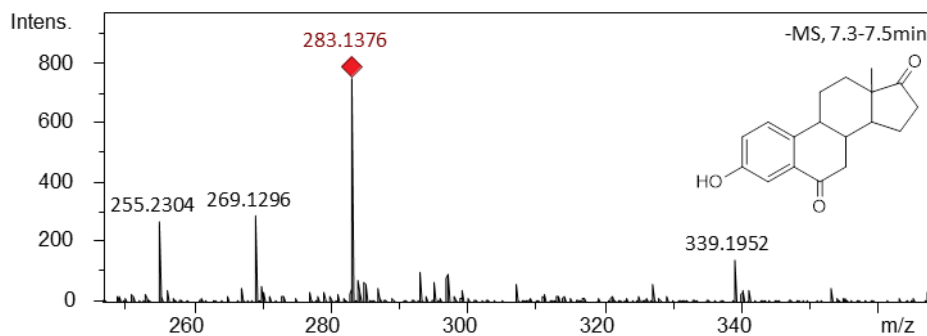
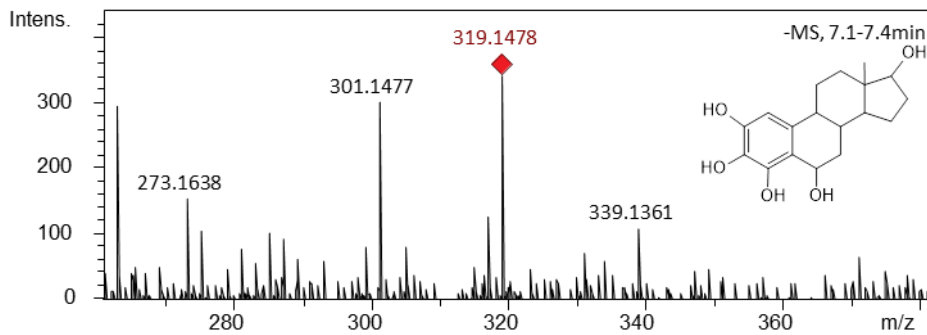


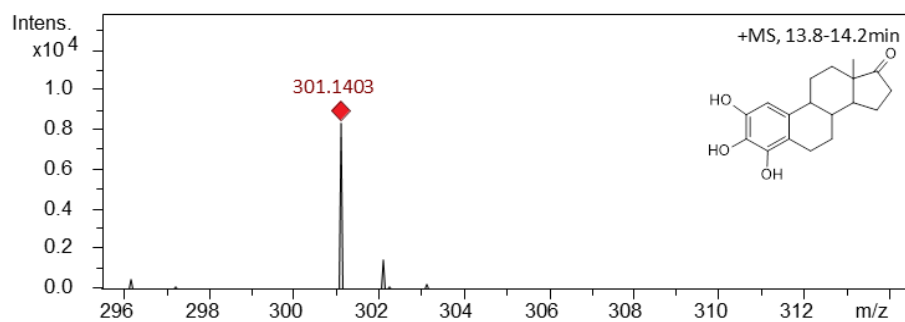
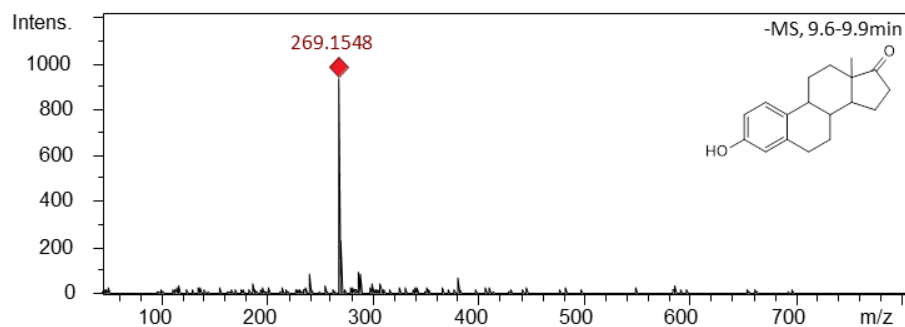
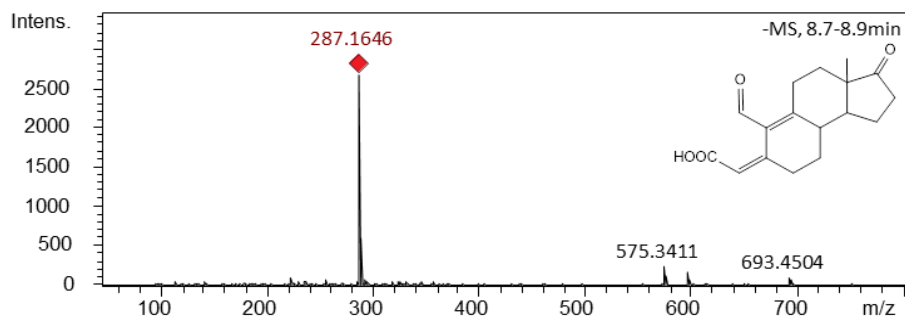




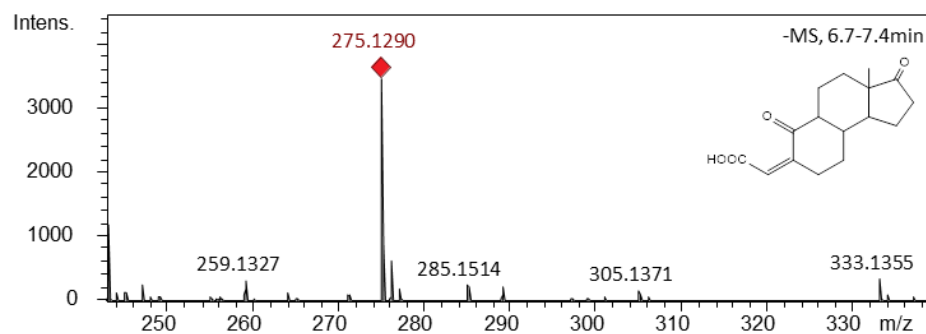
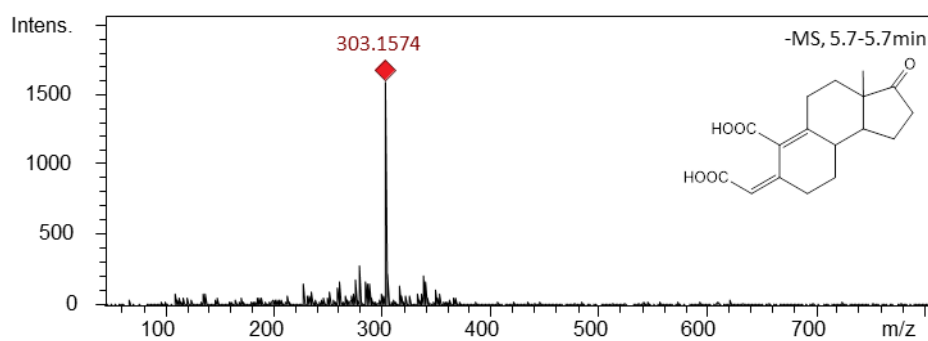
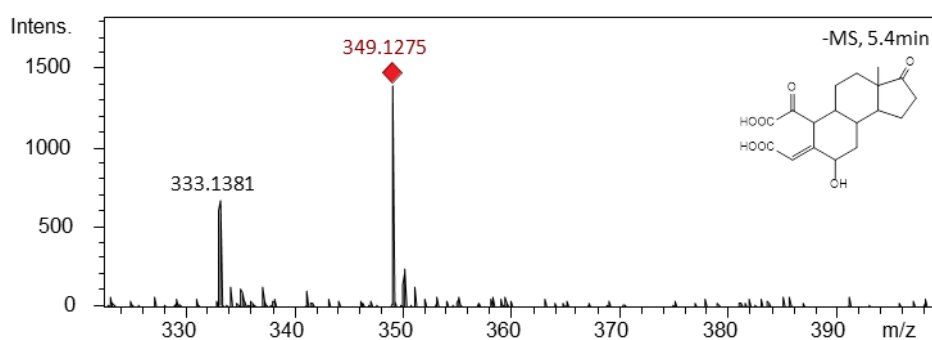
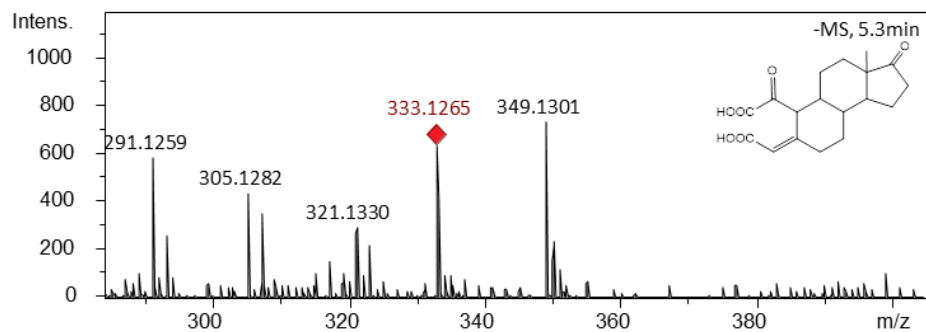
### C.3 – Espectros de massa do E1 e seus subprodutos gerados na foto-peroxidação (UV/TiO<sub>2</sub>).

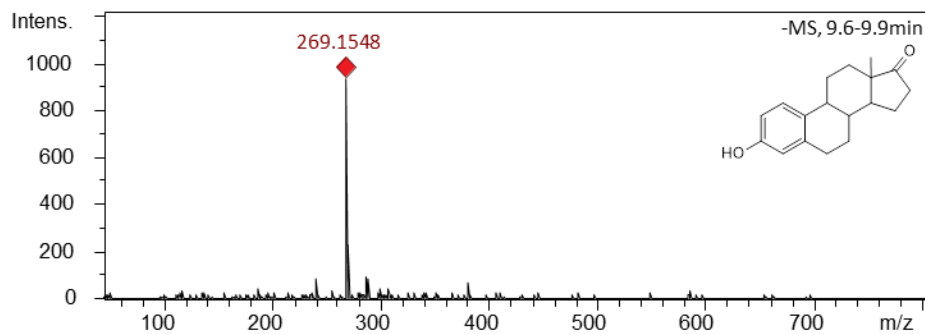
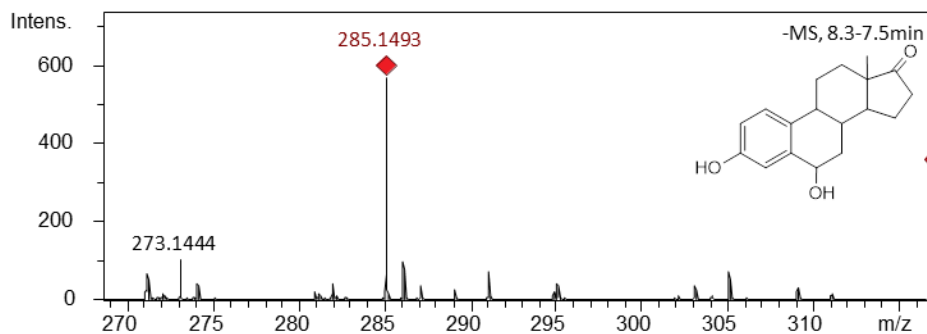
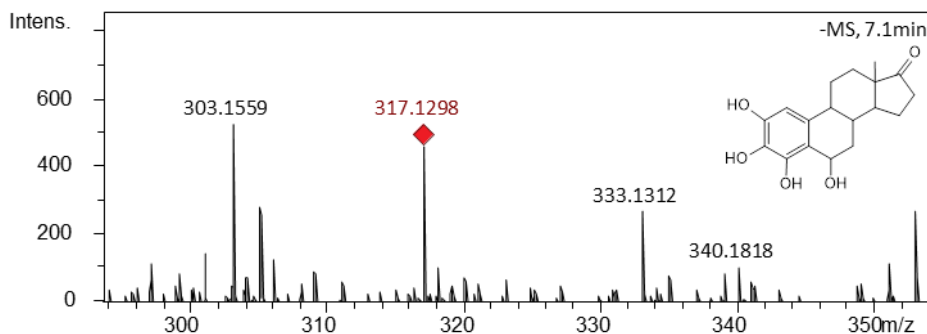
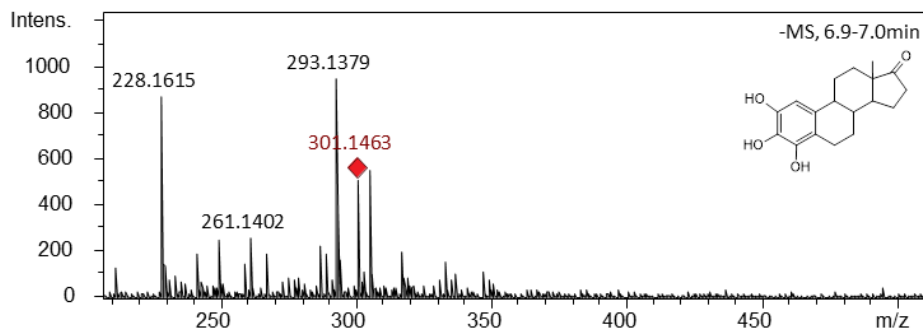
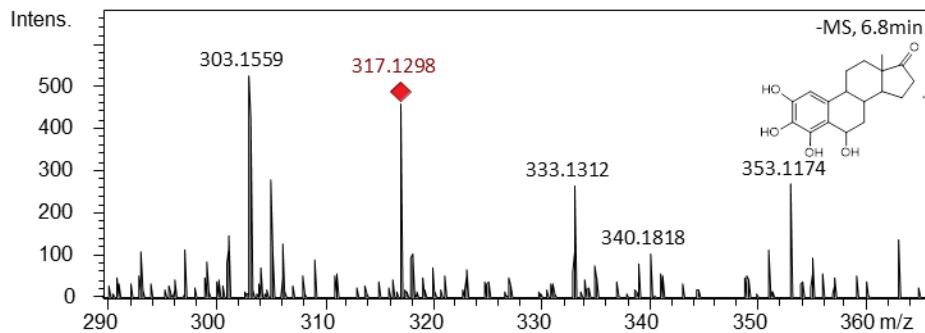


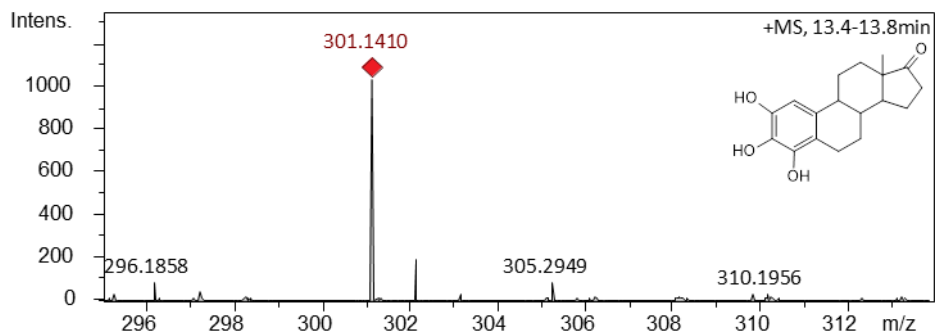
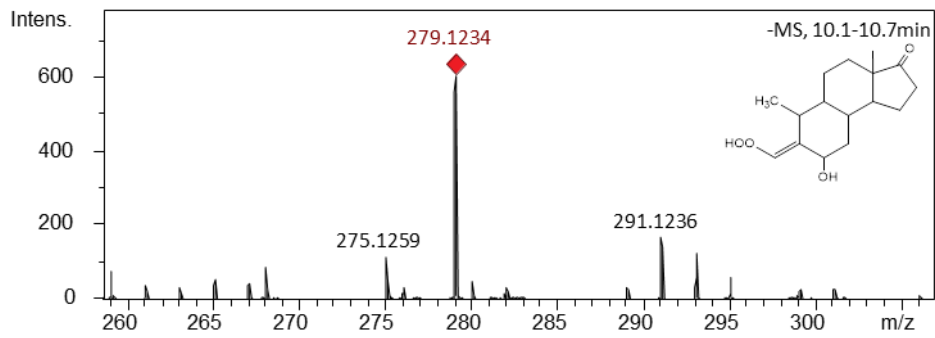




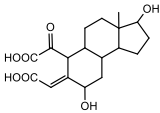
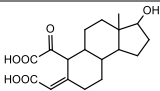
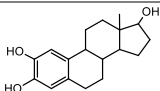
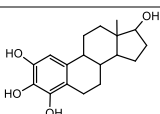
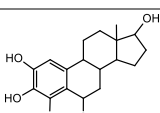
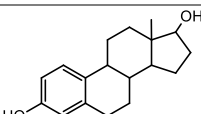
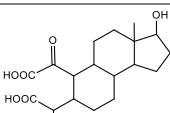
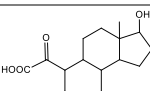
#### C.4 – Espectros de massa do E1 e seus subprodutos gerados na foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>).





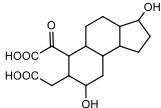


**APÊNDICE D** – Tabela dos produtos de transformação do E2 detectados nas reações UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub> identificados por HPLC/ESI-QTOFMS em modo positivo [M-H]<sup>+1</sup> e negativo [M-H]<sup>-1</sup>.

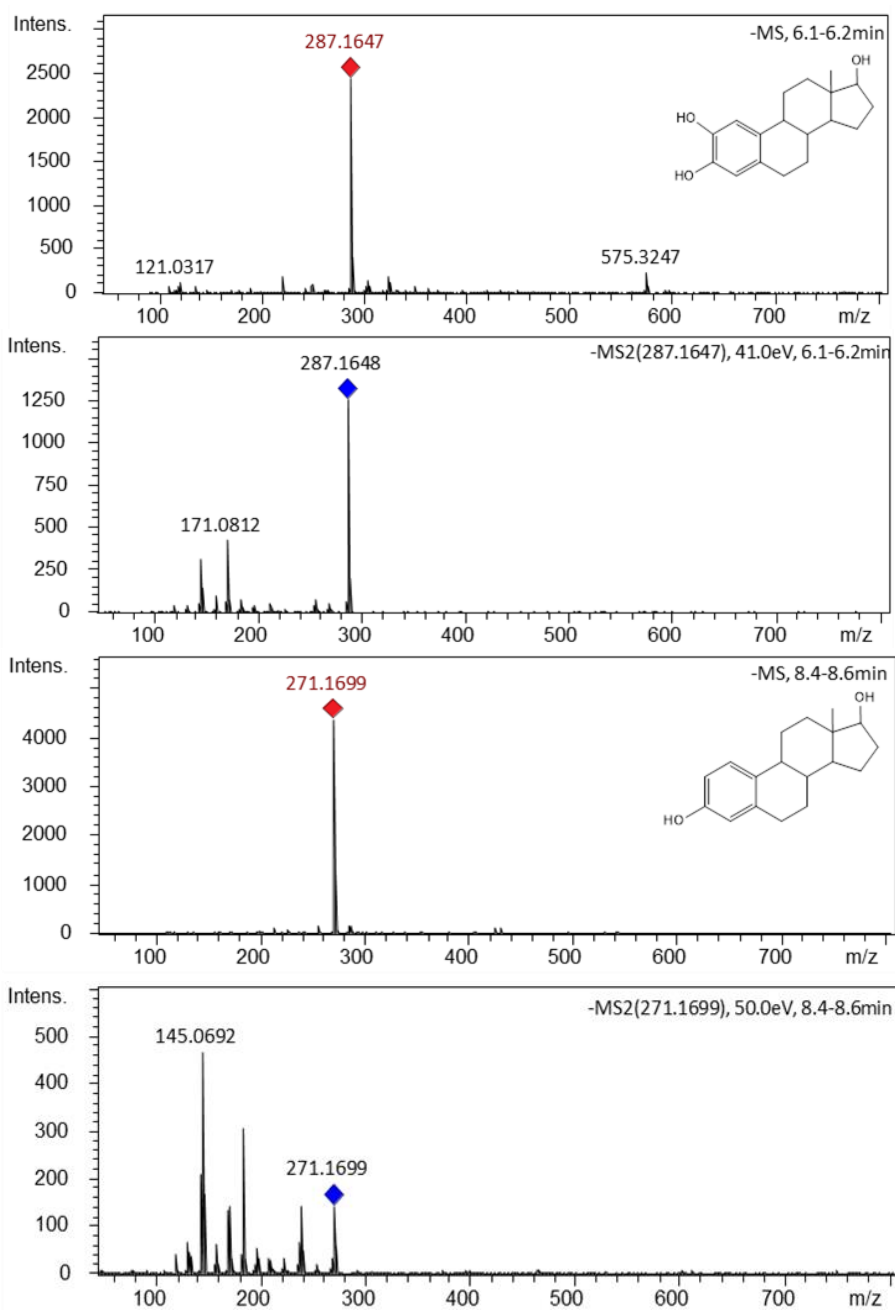
TP	TR (min)	Fórmula Molecular	m/z	Estrutura Proposta	Reação	Referencia
1	3.7	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	352		UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
2	4.9	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	336		UV/O <sub>3</sub>	(MAI et al., 2008)
3	6.1	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	288		Todas as reações	(DÍAZ et al., 2009; MAI et al., 2008; MBOULA et al., 2015)
4	6.3	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	304		UV/TiO <sub>2</sub>	(DÍAZ et al., 2009; MBOULA et al., 2015)
5	6.5	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	320		UV/O <sub>3</sub>	(MBOULA et al., 2015)
6 (E2)	8.4	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	271		Todas as reações	-
7	10.9	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	354		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(MAI et al., 2008)
8	12	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	324		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	Este estudo

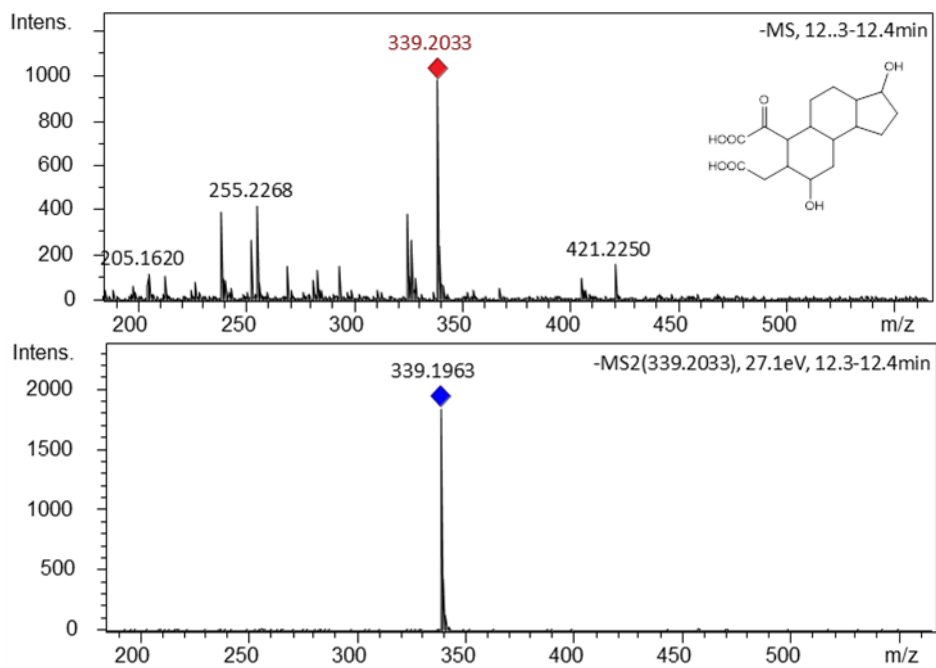


---

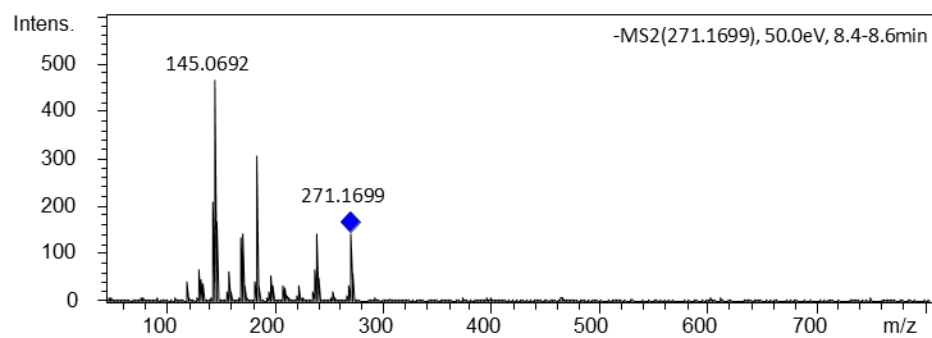
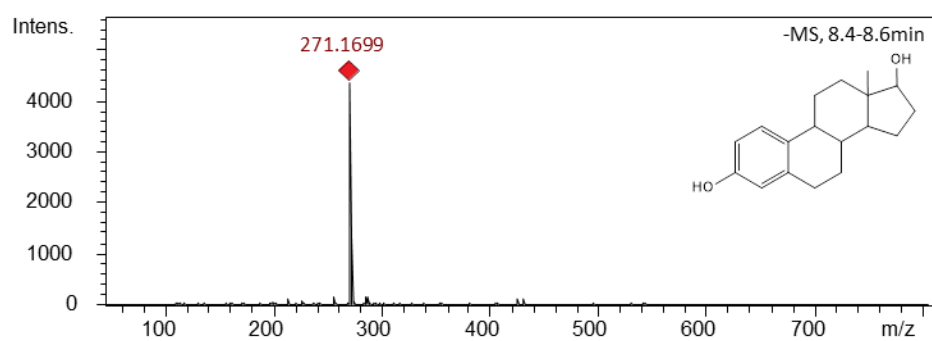
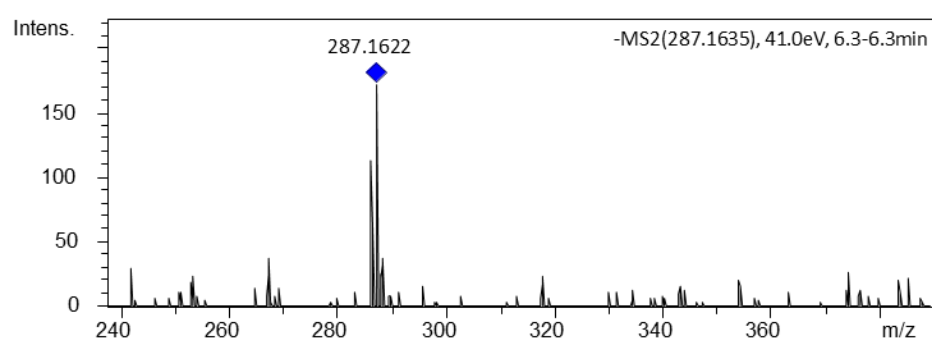
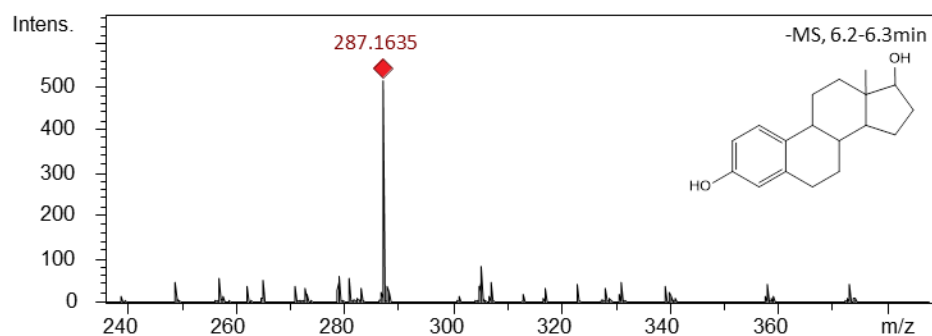
9	12.3	$C_{17}H_{24}O_7$	340		Todas as reações	Este estudo
---	------	-------------------	-----	---	---------------------	-------------

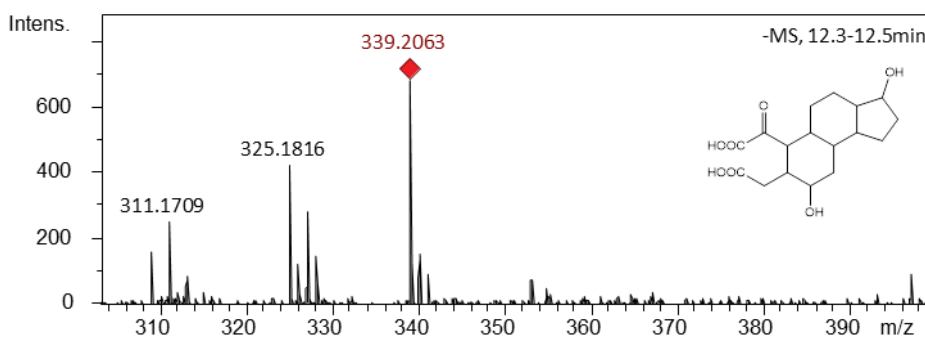
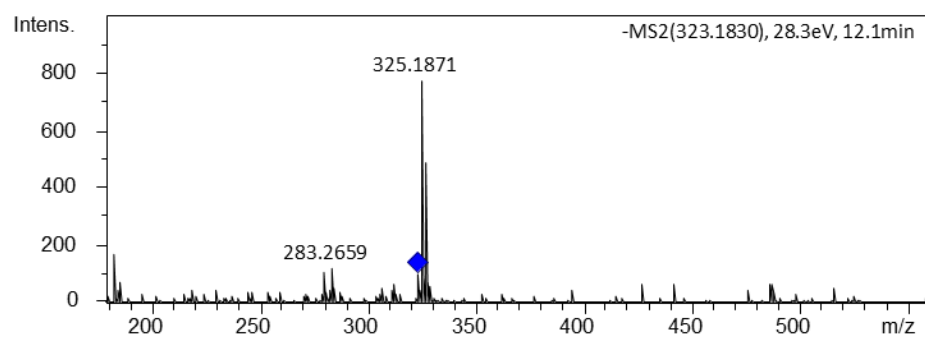
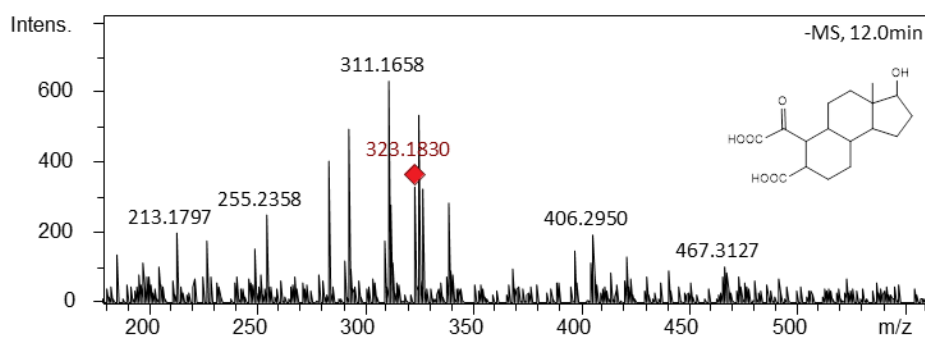
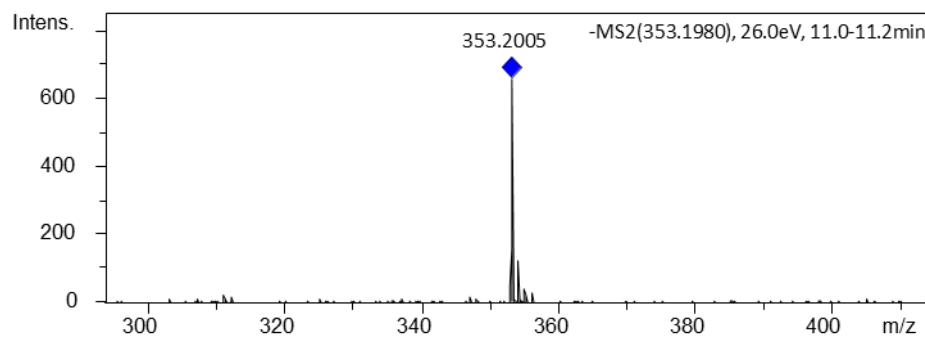
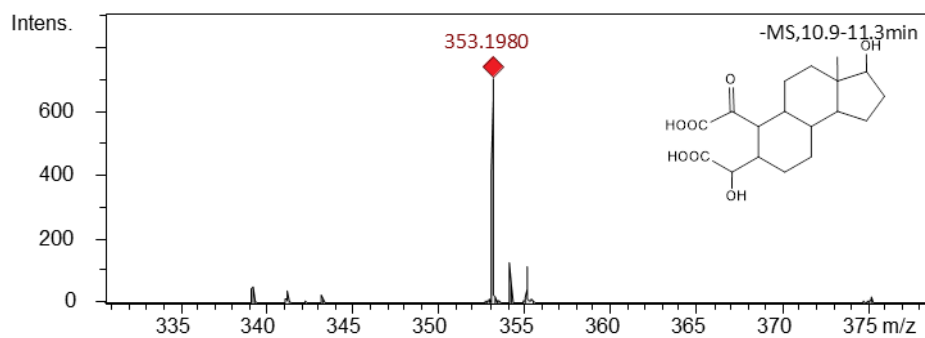
---

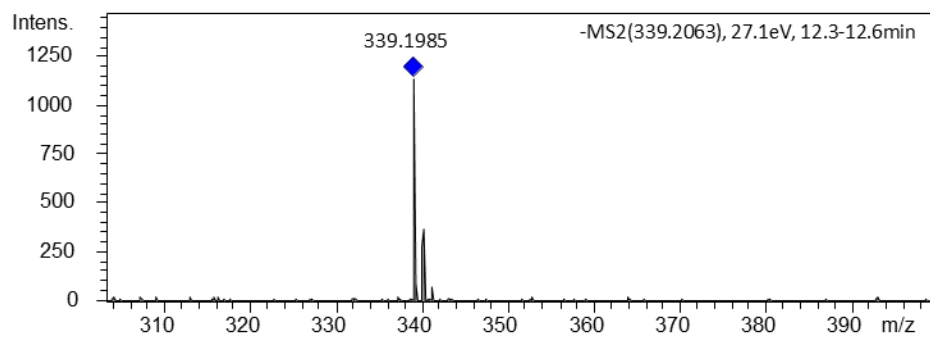
**APÊNDICE E – Espectros de Massa (MS) do E2 e seus subprodutos.****D.1 – Espectros de massa do E2 e seus subprodutos gerados na fotólise (UV).**



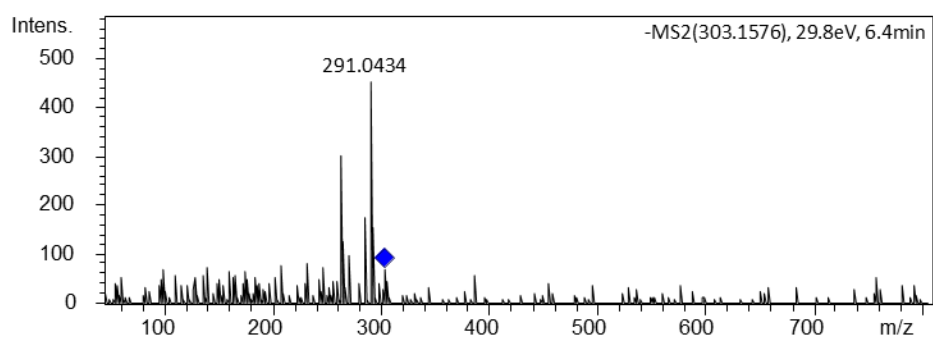
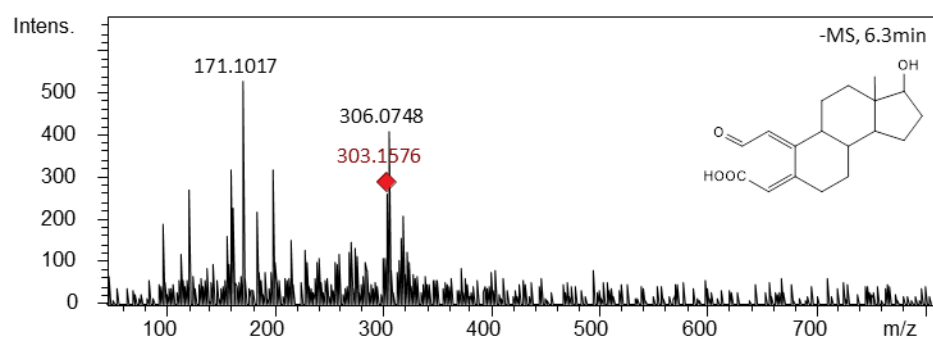
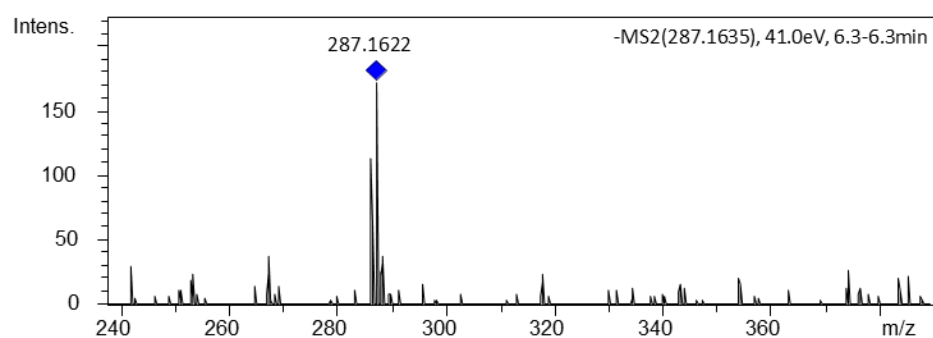
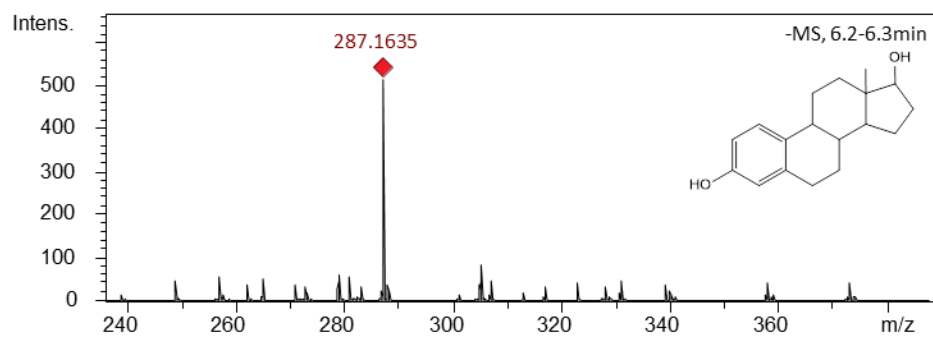
## D.2 – Espectros de massa do E2 e seus subprodutos gerados na foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

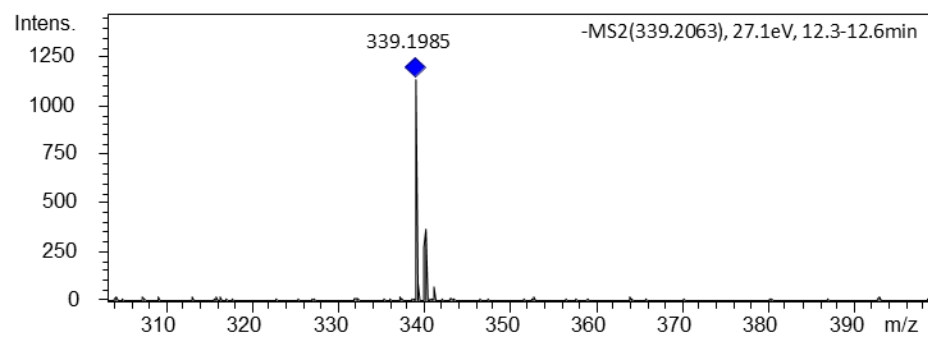
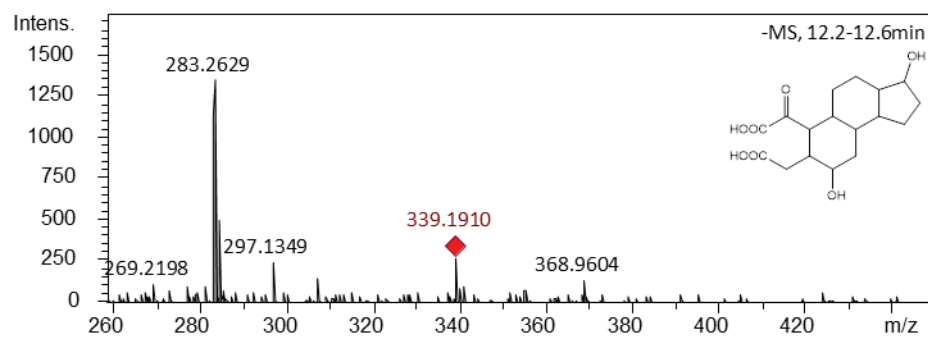
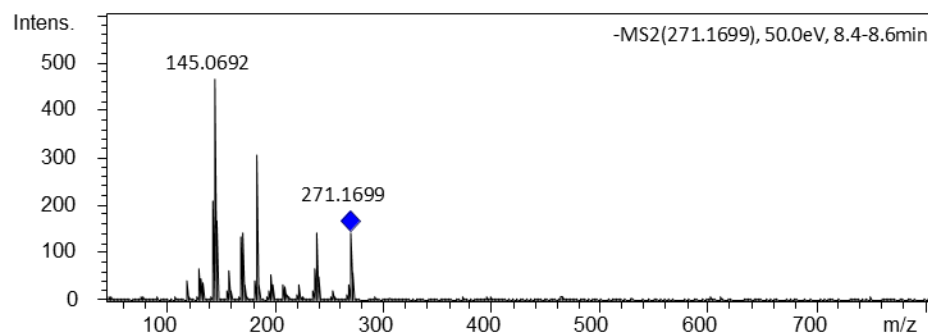
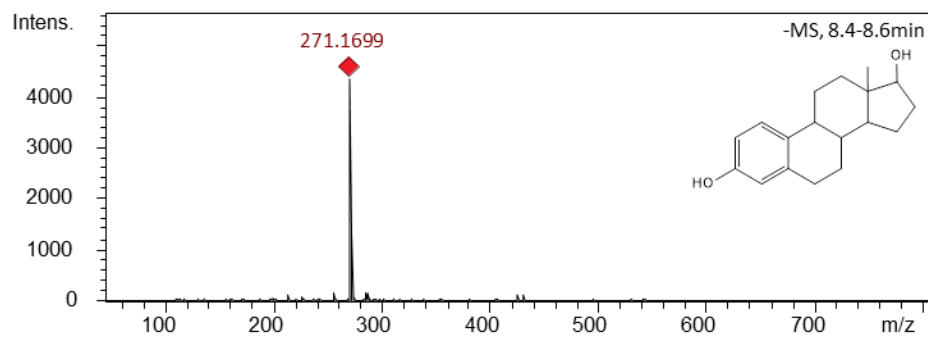






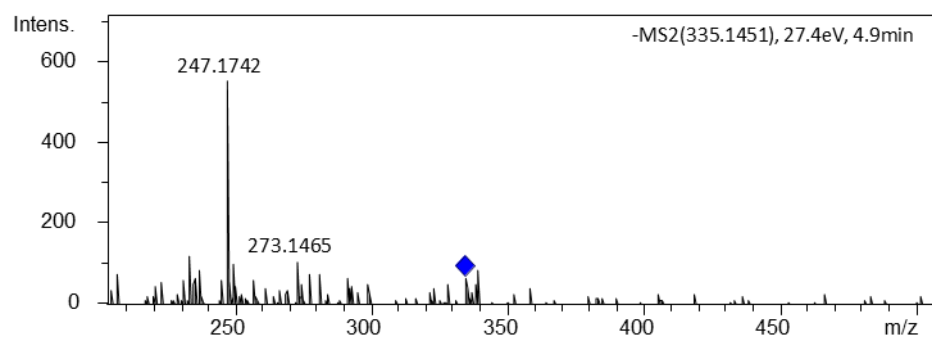
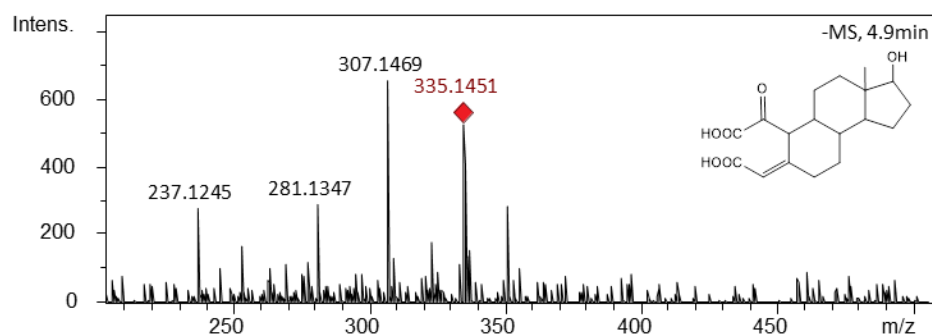
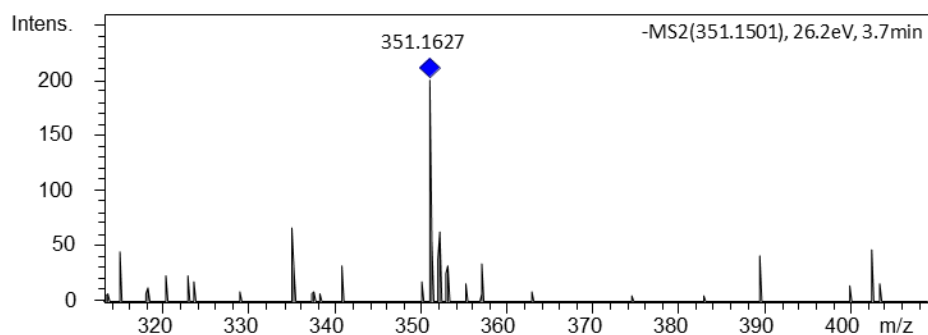
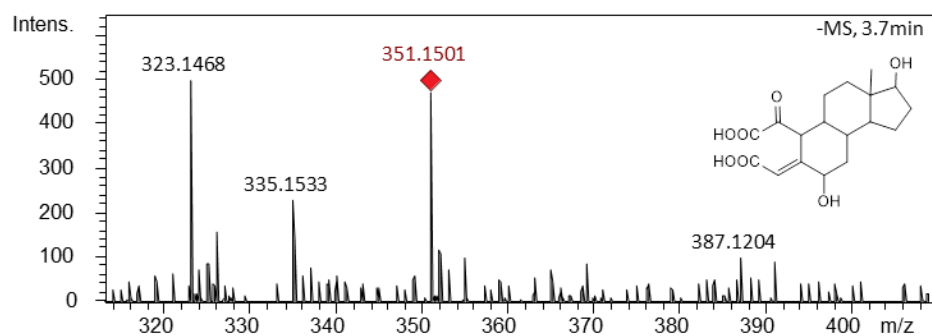
### D.3 – Espectros de massa do E2 e seus subprodutos gerados na fotocatálise (UV/TiO<sub>2</sub>).

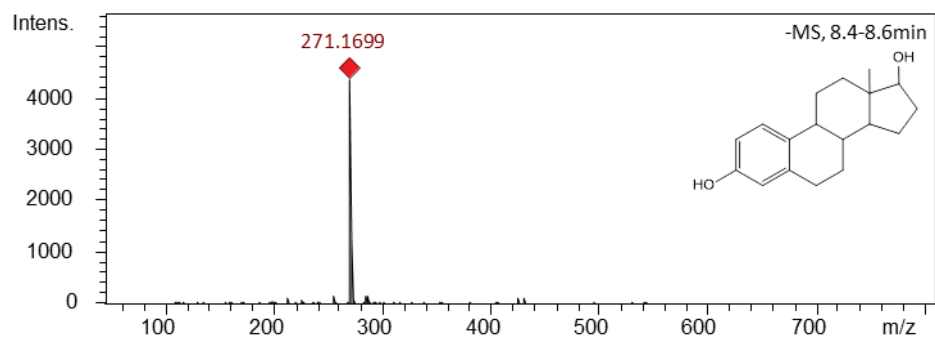
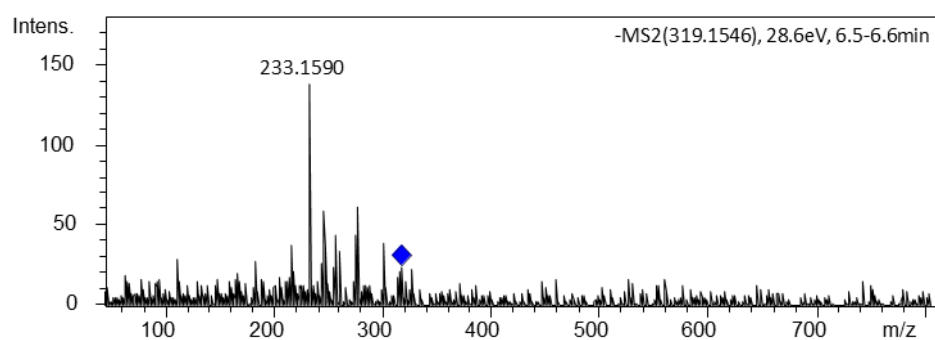
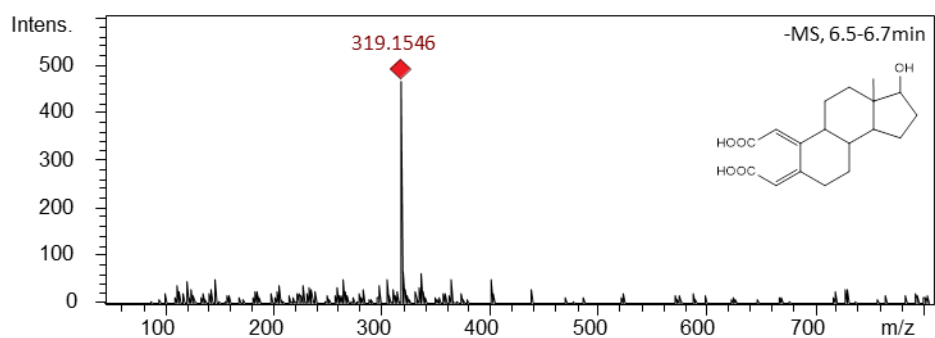
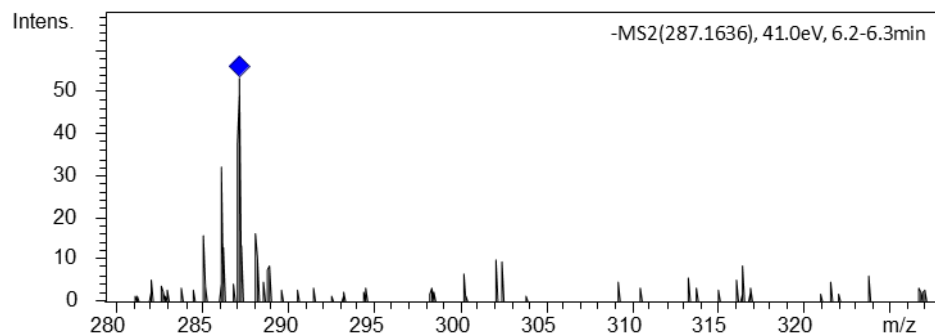
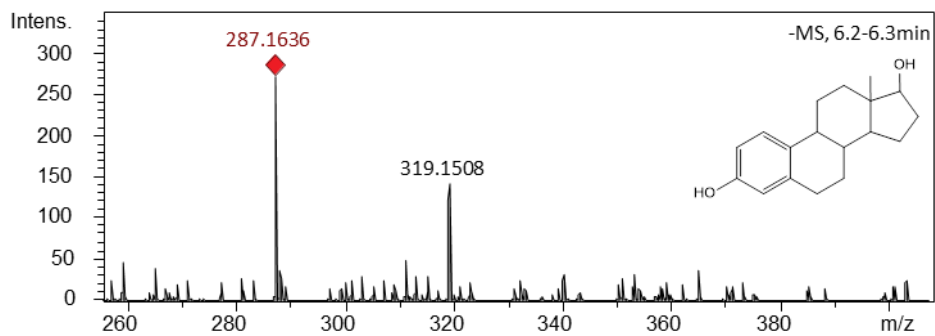


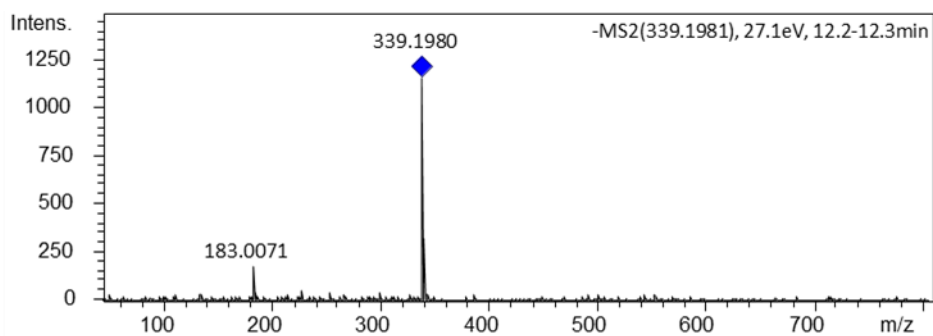
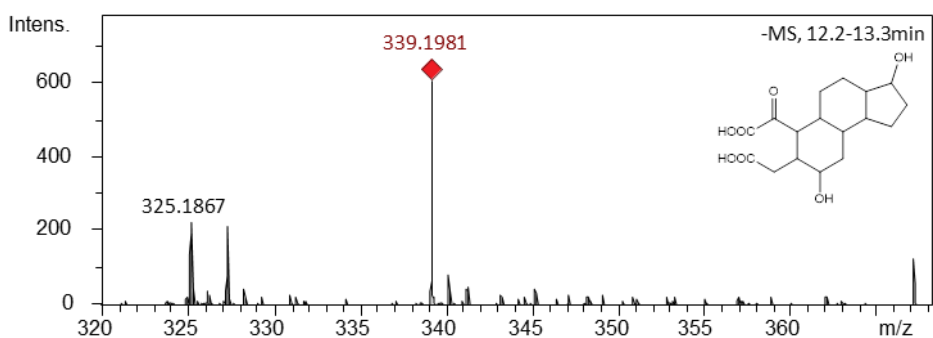
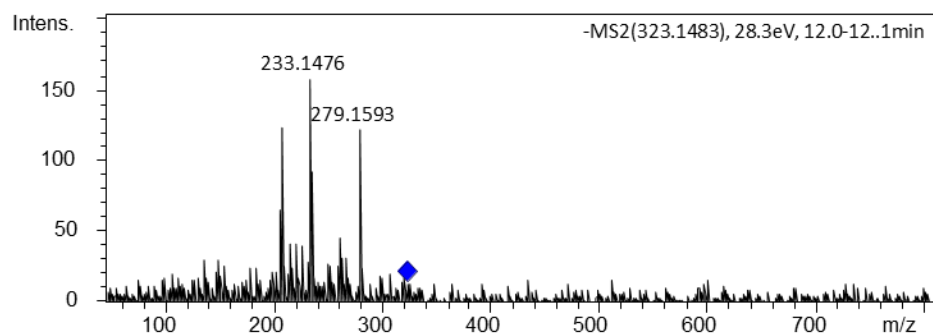
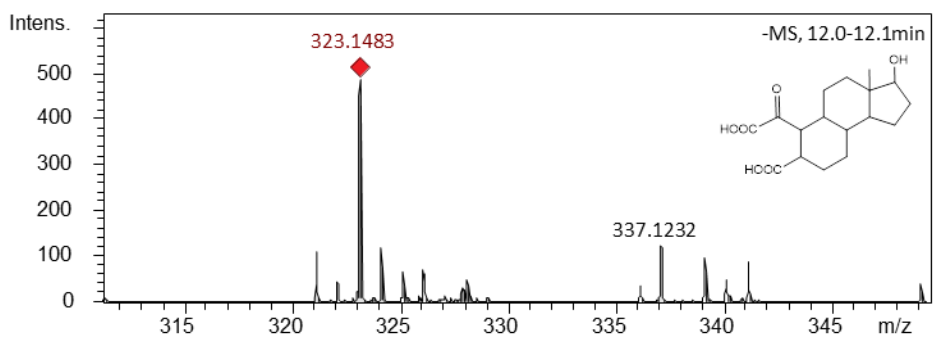
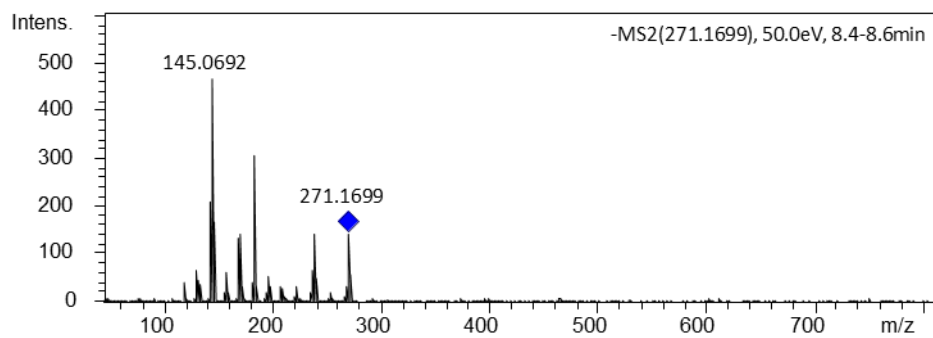




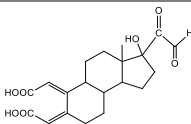
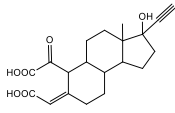
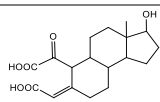
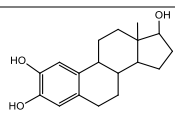
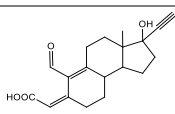
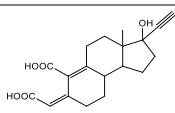
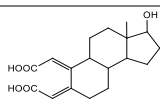
#### D.4 – Espectros de massa do E2 e seus subprodutos gerados na foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>).

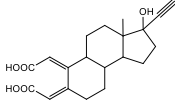
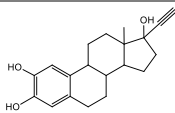
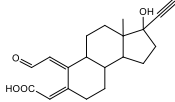
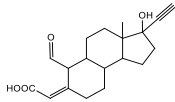
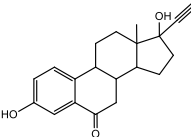
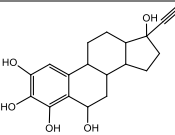
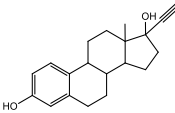


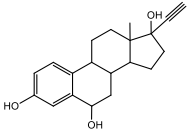
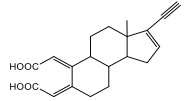
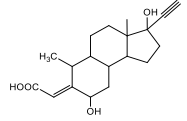
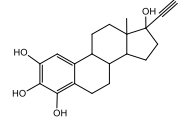
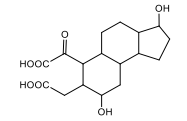
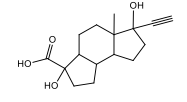




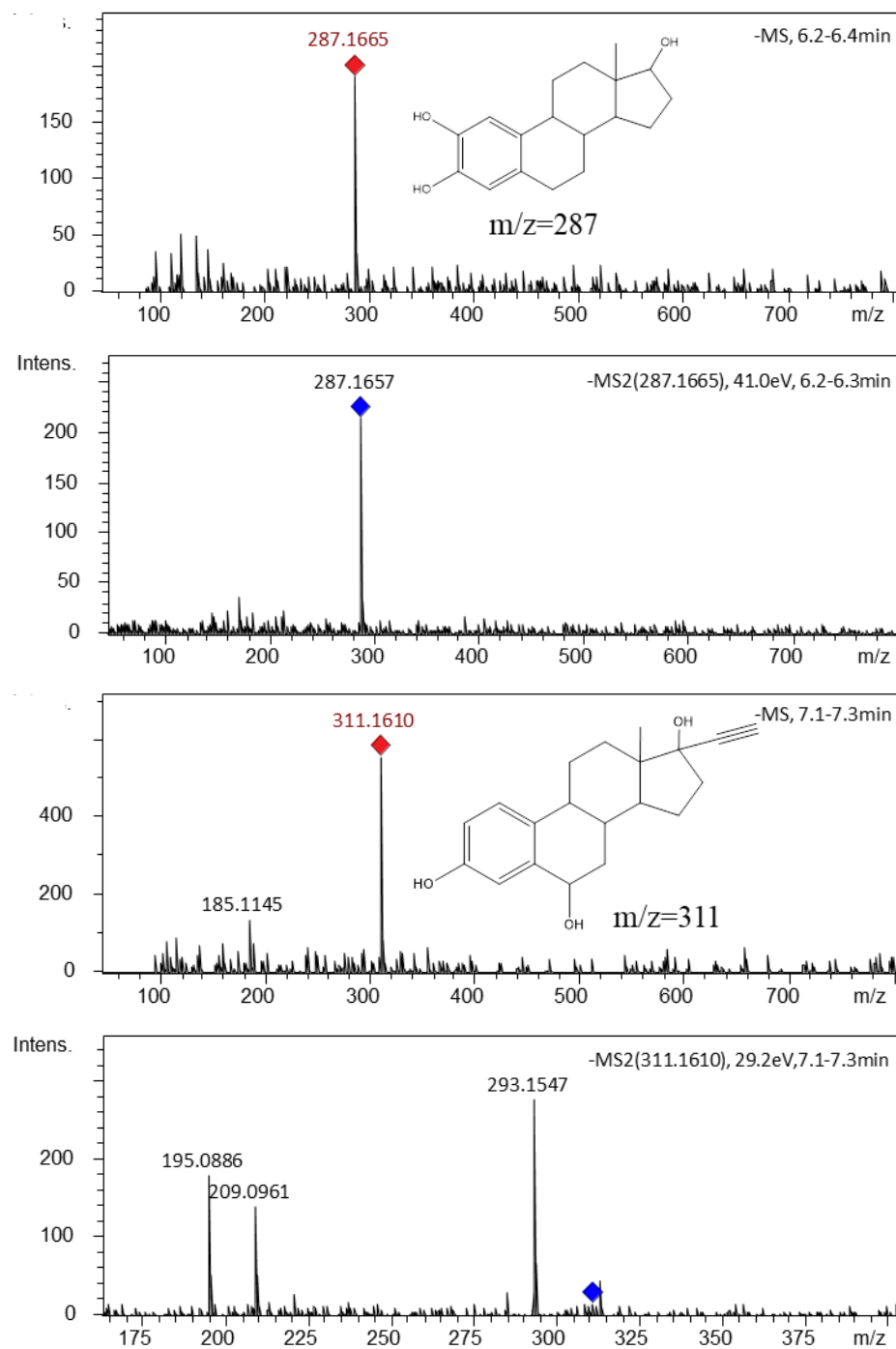
**APÊNDICE F** – Tabela dos produtos de transformação do EE2 detectados nas reações UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub> identificados por HPLC/ESI-QTOFMS em modo positivo [M-H]<sup>+</sup> e negativo [M-H]<sup>-</sup>.

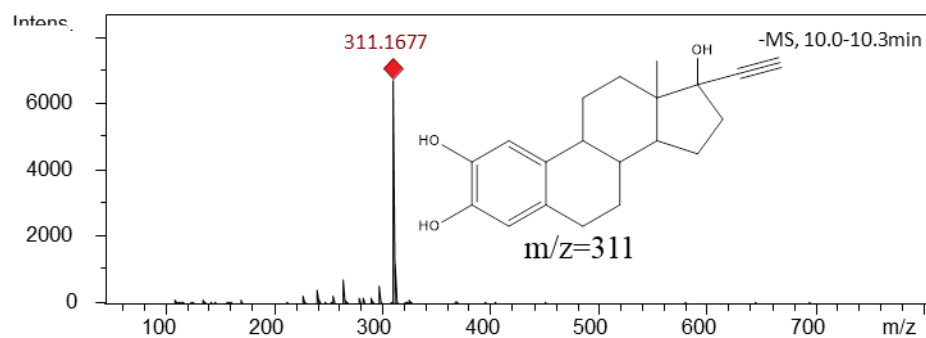
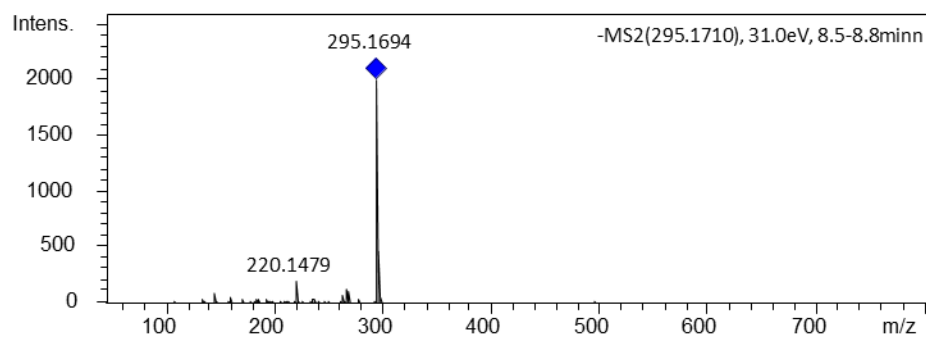
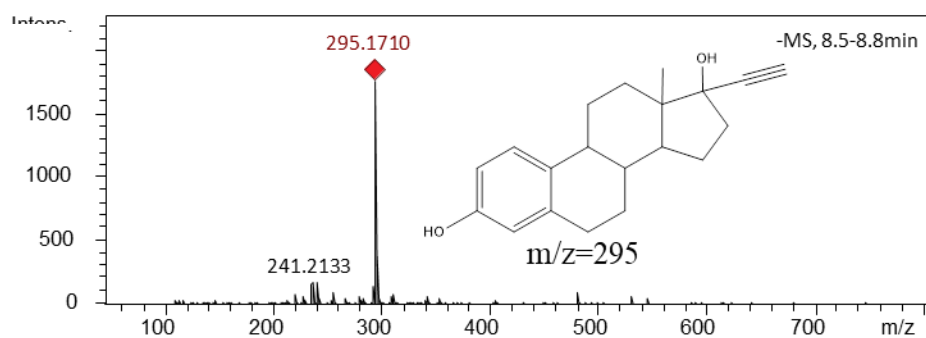
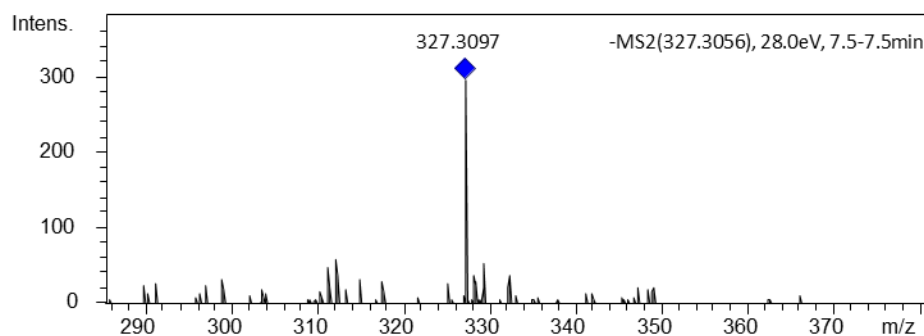
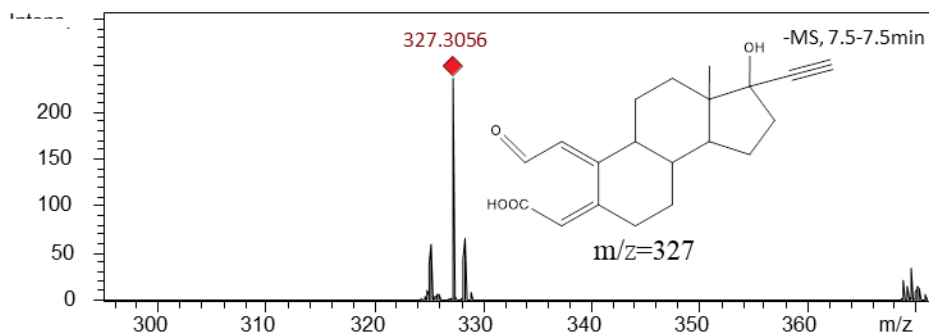
N.I.	TR (min)	Fórmula		Estrutura		Reação	Referência
		Molecular	m/z	Proposta			
1	5.4	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	376			UV/O <sub>3</sub>	(VIEIRA; NASCENTES; AUGUSTI, 2010)
2	5.5	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	360			UV/O <sub>3</sub>	(SUN et al., 2010)
3	5.8	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	336			UV/O <sub>3</sub>	(MAI et al., 2008)
4	6.2	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	288			UV	(MAI et al., 2008; MBOULA et al., 2015)
5	6.3	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	314			UV/O <sub>3</sub>	(SUN et al., 2010)
6	6.6	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	330			UV/O <sub>3</sub>	(ZHOU et al., 2018)
7	6.9	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	320			UV/TiO <sub>2</sub>	(IRMAK; ERBATUR; AKGERMAN, 2005)

<b>8</b>	7.0	$C_{20}H_{24}O_5$	344		UV/O <sub>3</sub>	(VIEIRA; NASCENTES; AUGUSTI, 2010)
<b>9</b>	7.1	$C_{20}H_{24}O$	312		Todas as reações	(LEECH; SNYDER; WETZEL, 2009; REN et al., 2017; SUN et al., 2010; VIEIRA; NASCENTES; AUGUSTI, 2010; ZHOU et al., 2018)
<b>10</b>	7.5	$C_{20}H_{24}O_4$	328		UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub>	(SUN et al., 2010)
<b>11</b>	7.8	$C_{19}H_{24}O_4$	316		UV/TiO <sub>2</sub>	(ZHOU et al., 2018)
<b>12</b>	7.9	$C_{20}H_{22}O_3$	310		UV/TiO <sub>2</sub>	(SUN et al., 2010)
<b>13</b>	8.1	$C_{20}H_{24}O_5$	344		UV/TiO <sub>2</sub> ,	(SUN et al., 2010; ZHOU et al., 2018)
<b>14</b> (EE2 )	8.5	$C_{20}H_{24}O_2$	296		Todas as reações	-

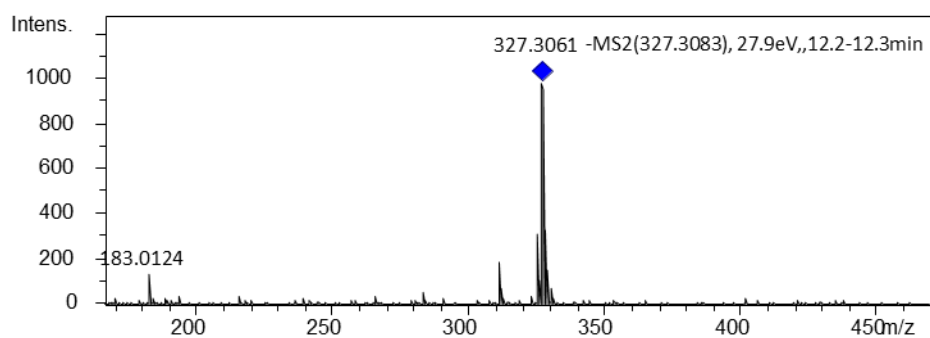
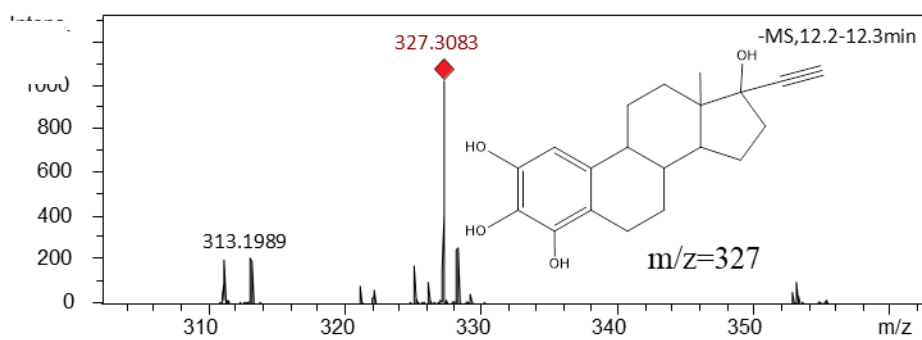
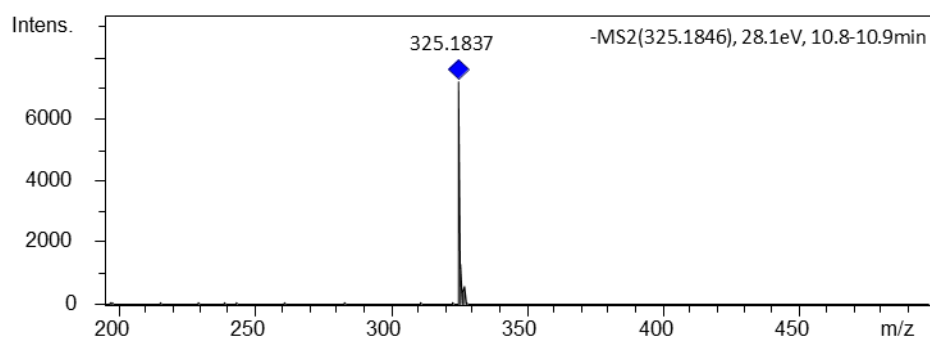
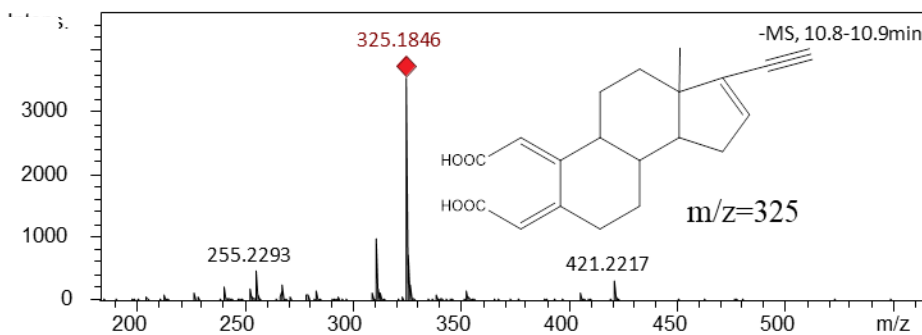
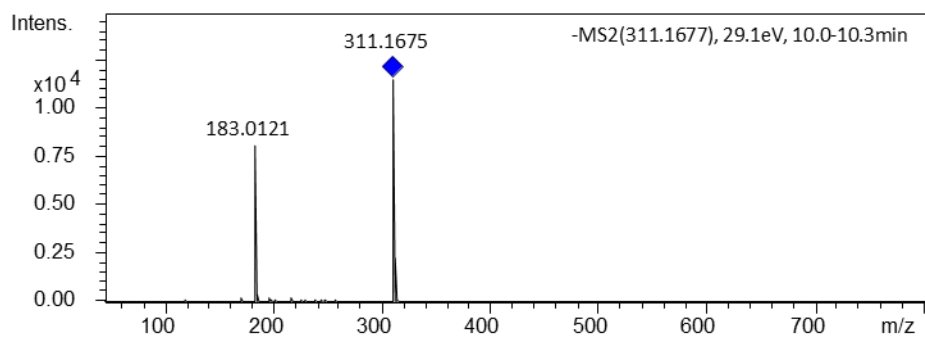
15	10	$C_{20}H_{24}O_3$	312		Todas as reações	(REN et al., 2019; SUN et al., 2010)
16	10.8	$C_{20}H_{22}O_4$	326		UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	(VIEIRA; NASCENTES; AUGUSTI, 2010)
17	10.1	$C_{18}H_{26}O_4$	306*		UV/TiO <sub>2</sub>	(PEREIRA et al., 2011)
18	12.2	$C_{20}H_{24}O_4$	328		UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	(ZHOU et al., 2018)
19	13.5	$C_{17}H_{24}O_7$	340		UV, UV/O <sub>3</sub>	(ZHOU et al., 2018)
20	13.4	$C_{16}H_{22}O_4$	278*		UV/TiO <sub>2</sub> , UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,	(FRONTISTIS et al., 2012)

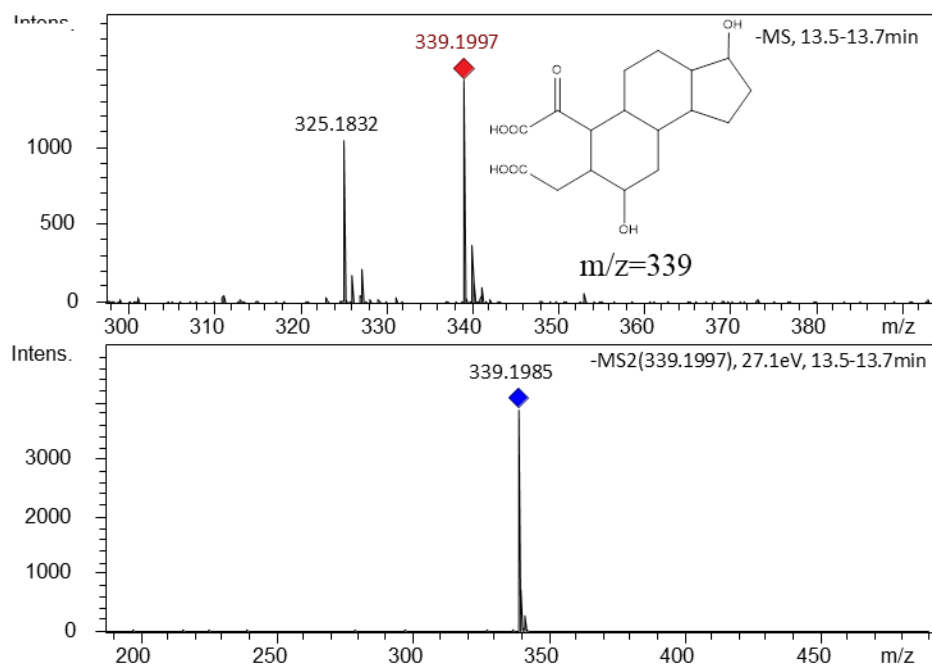
Nota: \*produto encontrado no modo positivo. N.I.= número de identificação; TR= tempo de retenção.

**APÊNDICE G – Espectros de Massa (MS e MS<sup>2</sup>) do EE2 e seus subprodutos.****G.1 – Espectros de massa do EE2 e seus subprodutos gerados na fotólise (UV).**

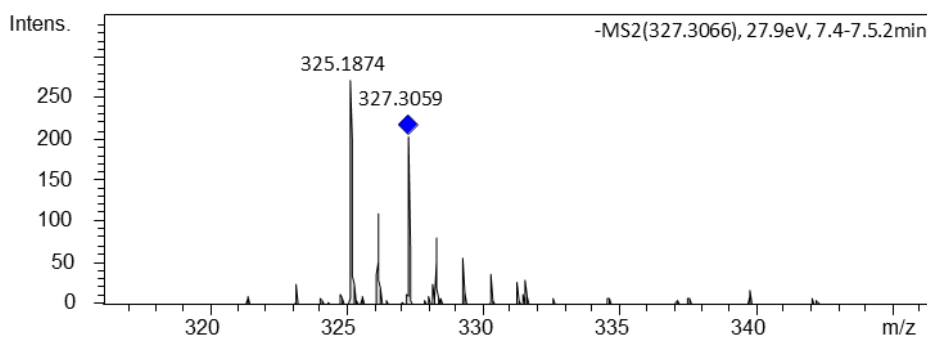
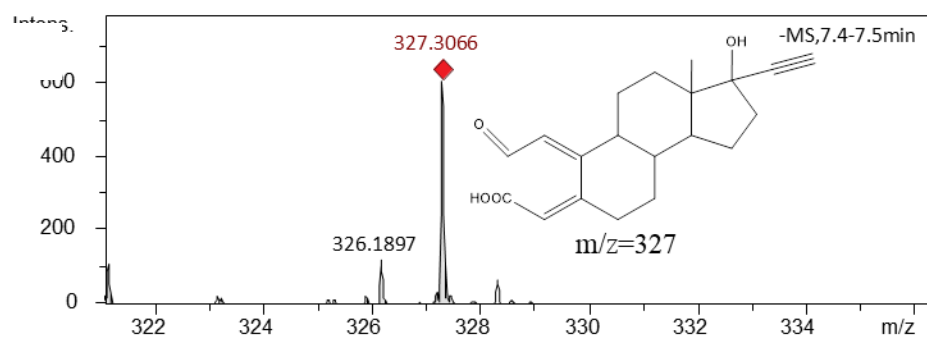
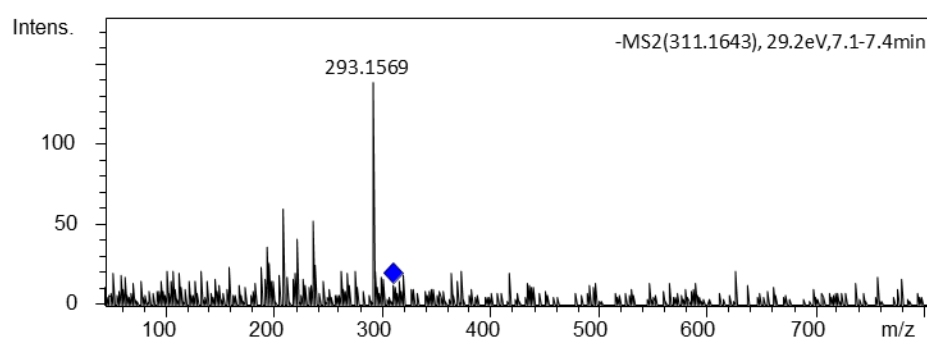
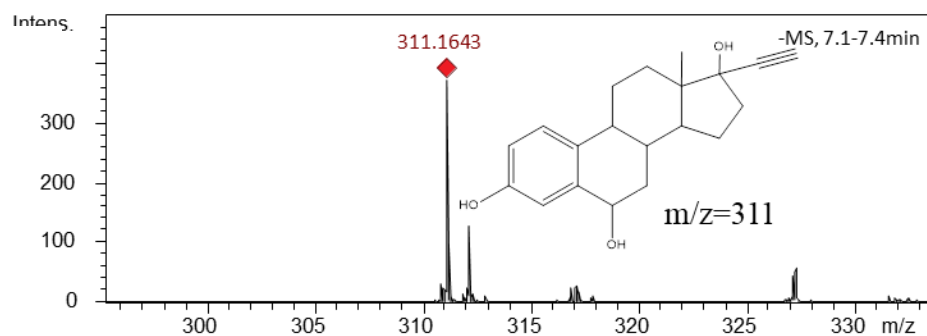


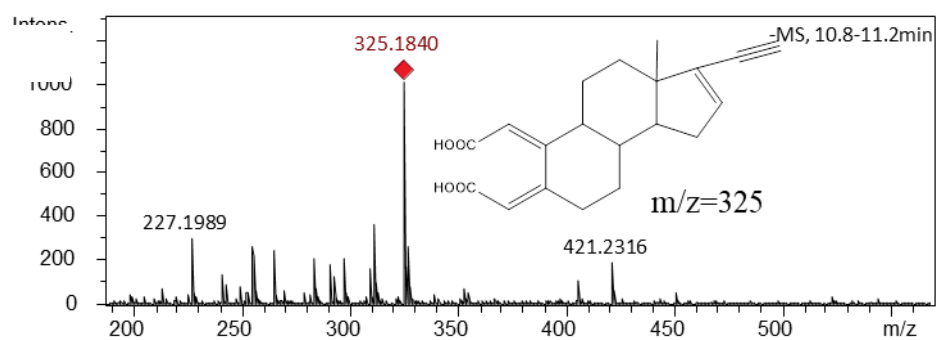
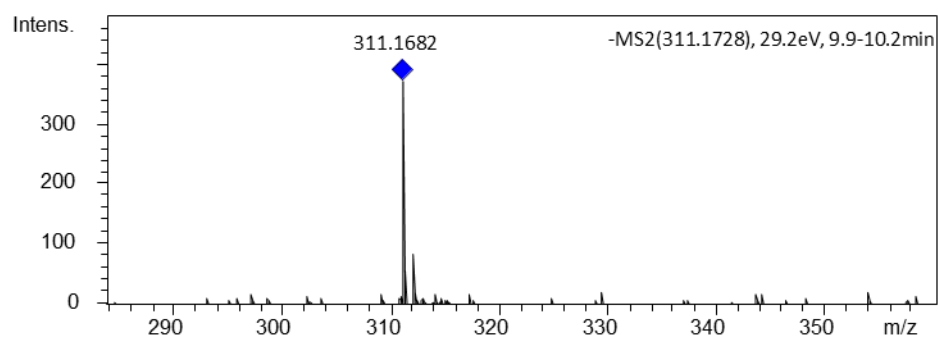
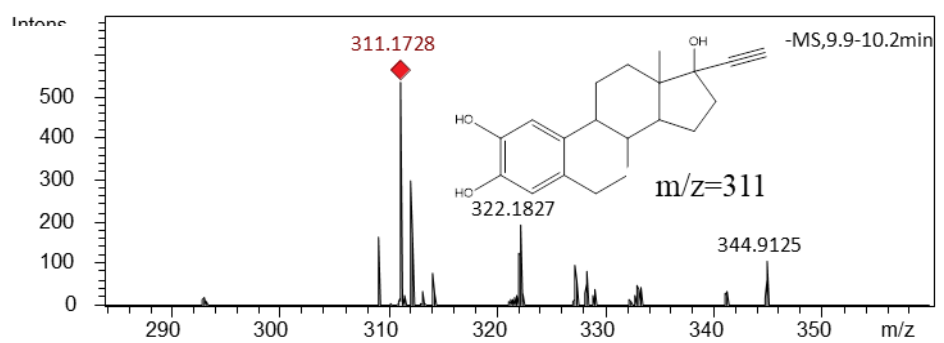
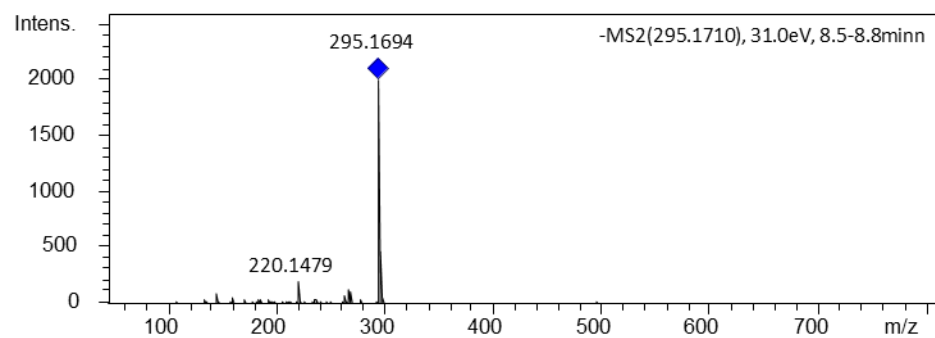
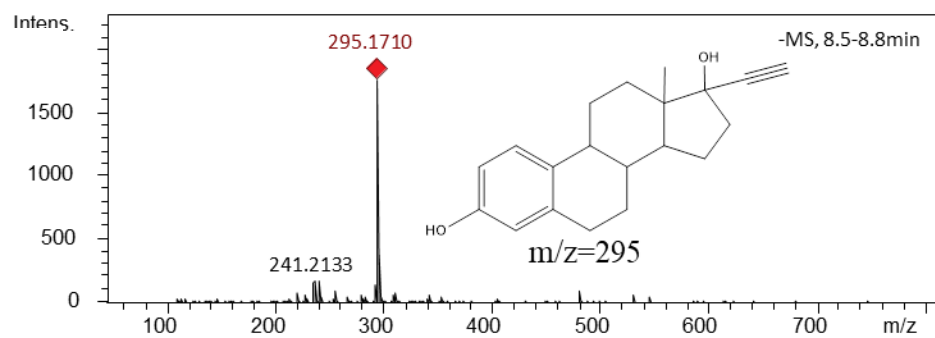


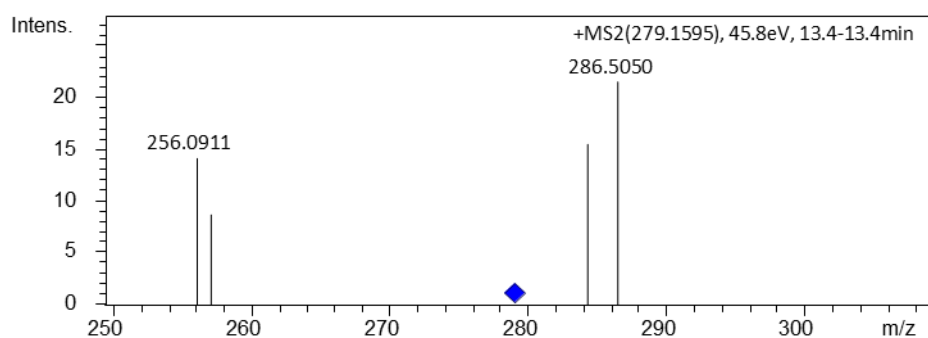
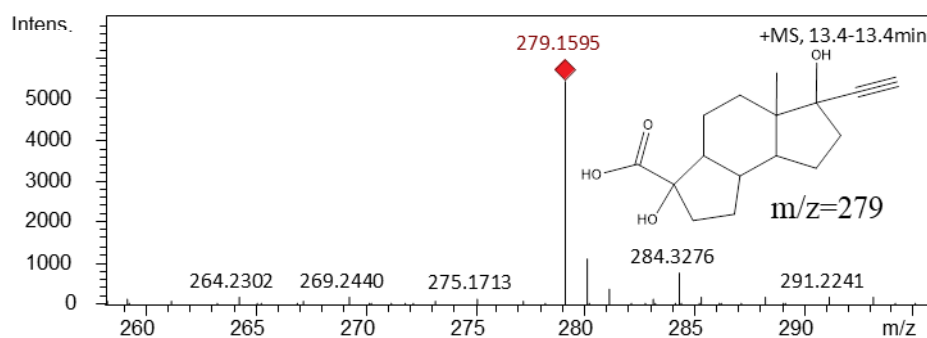
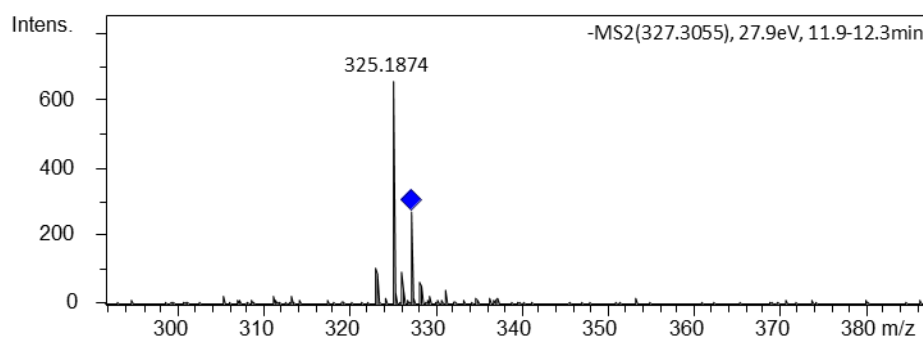
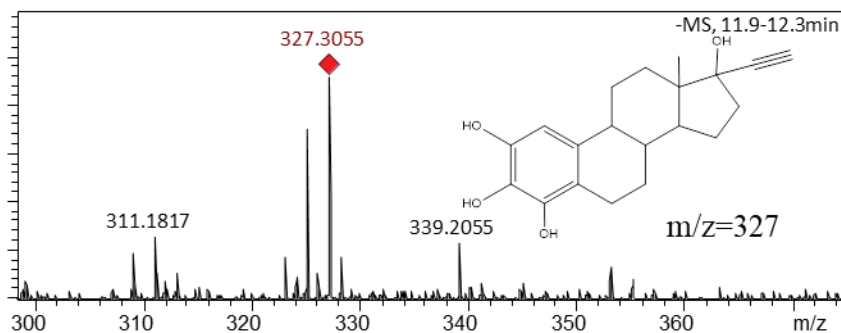
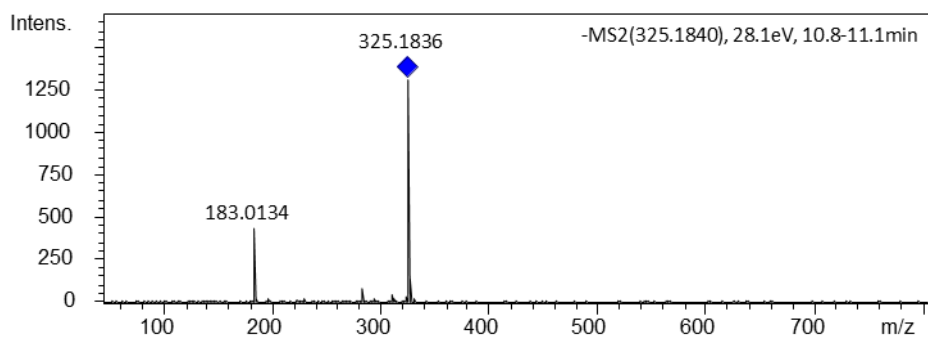




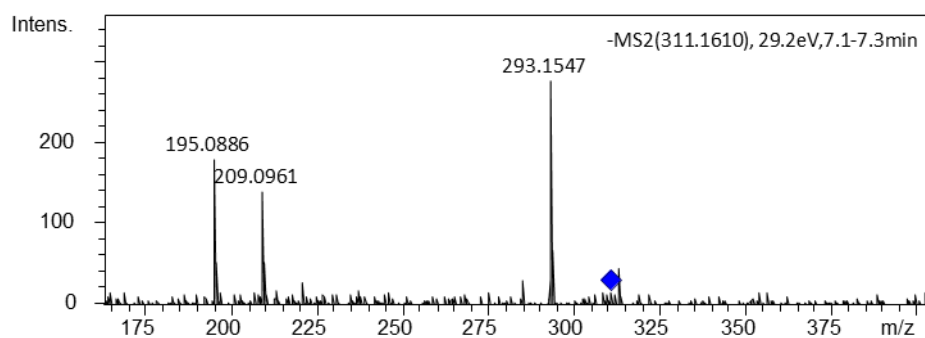
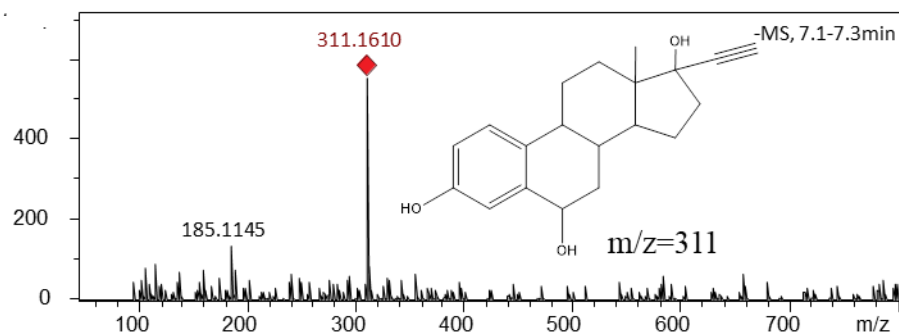
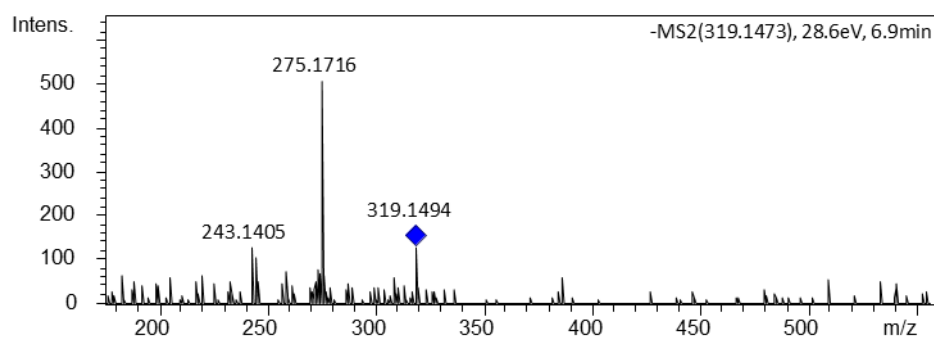
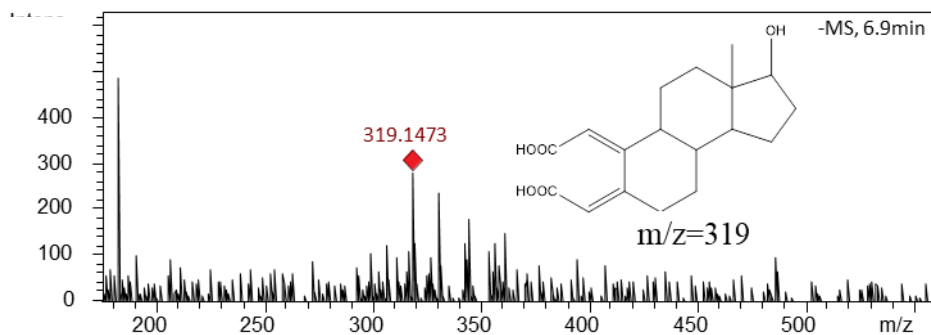
## G.2 – Espectros de massa do EE2 e seus subprodutos gerados na foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

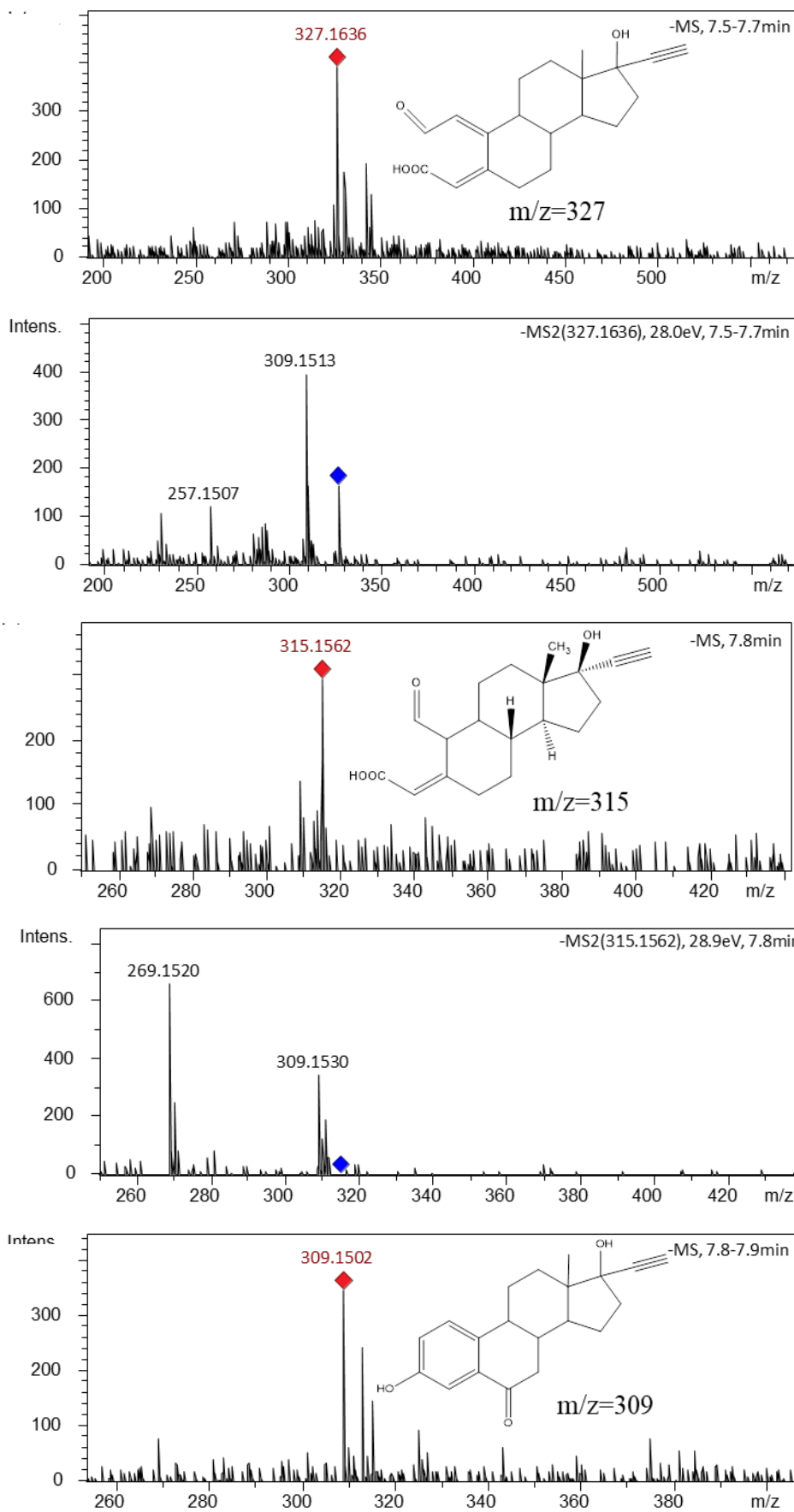


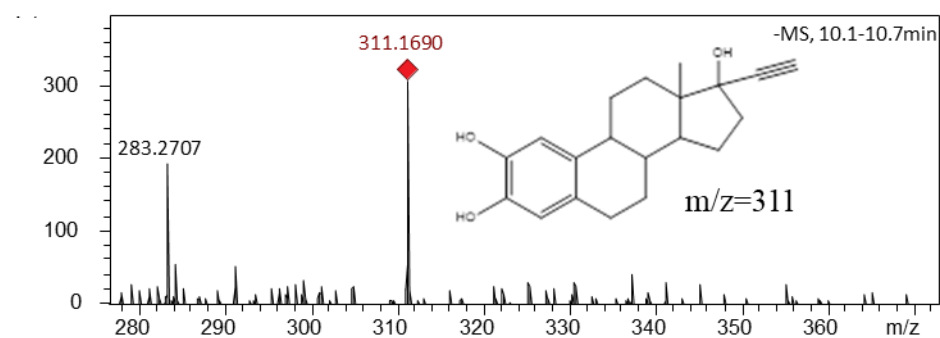
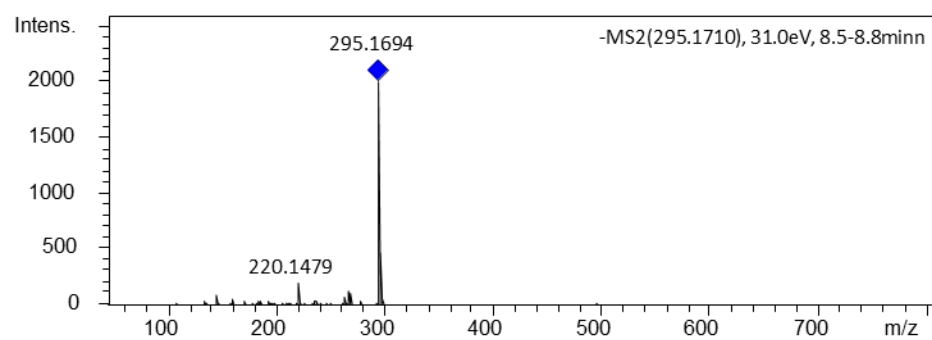
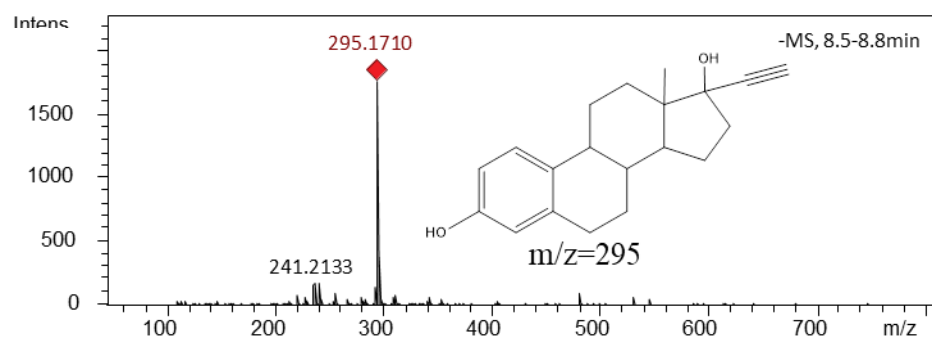
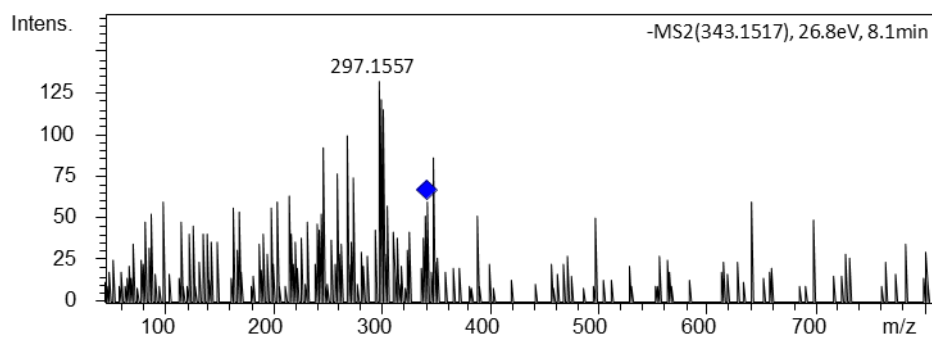
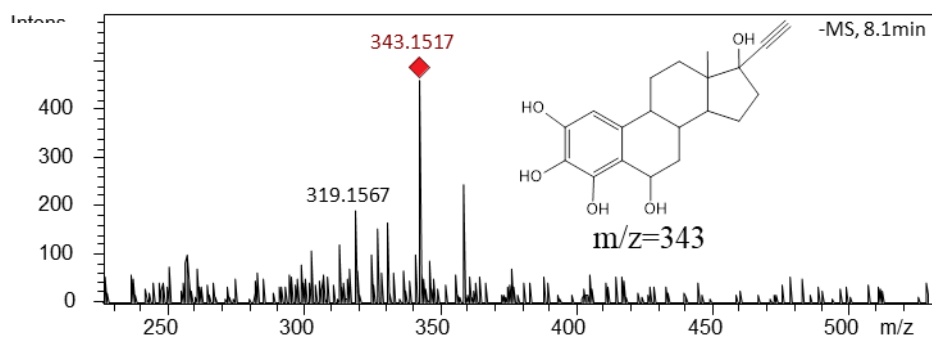




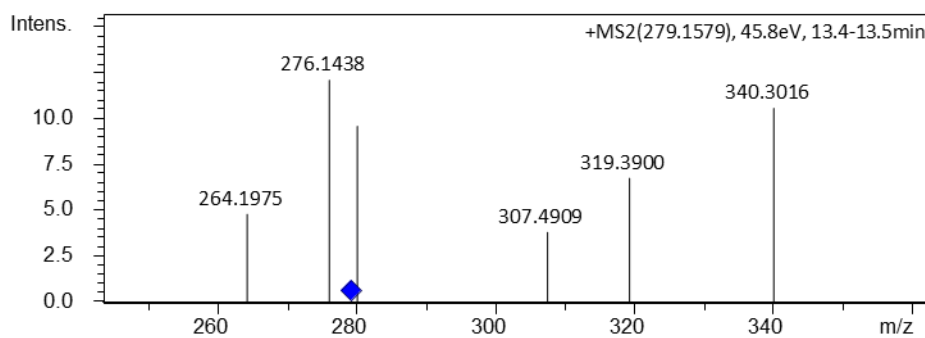
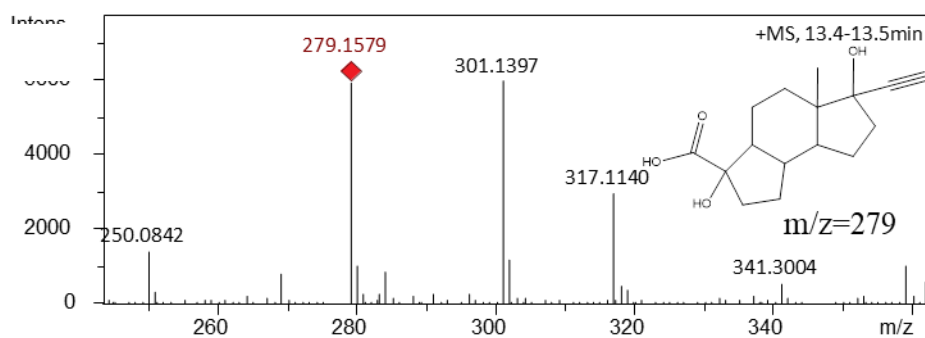
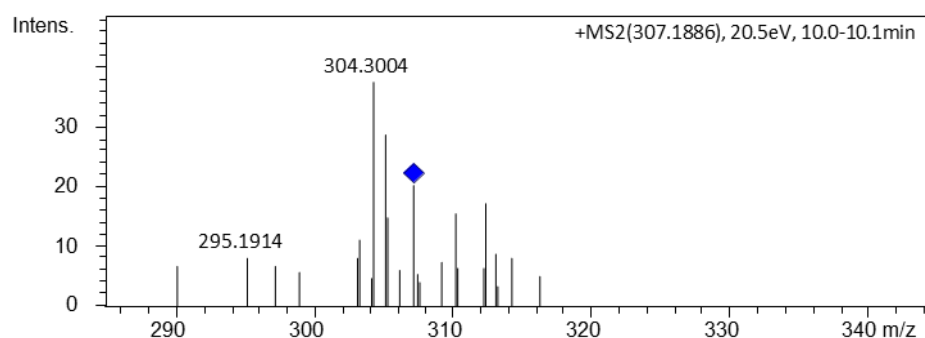
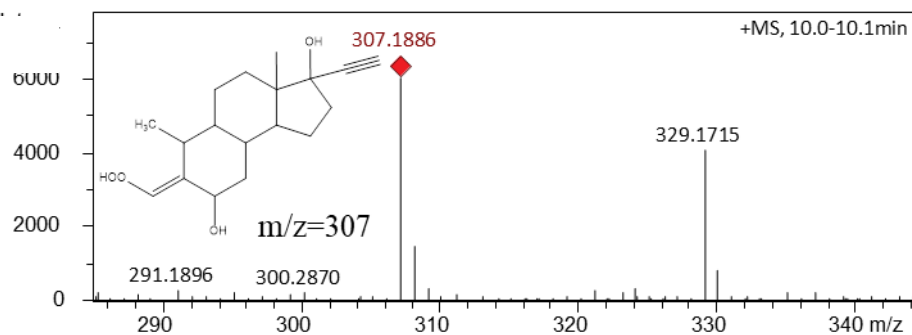
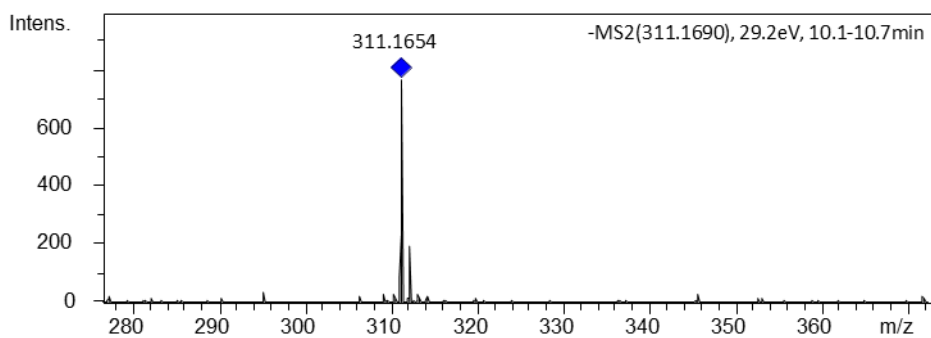
### G.3 – Espectros de massa do EE2 e seus subprodutos gerados na fotocatalise (UV/TiO<sub>2</sub>).



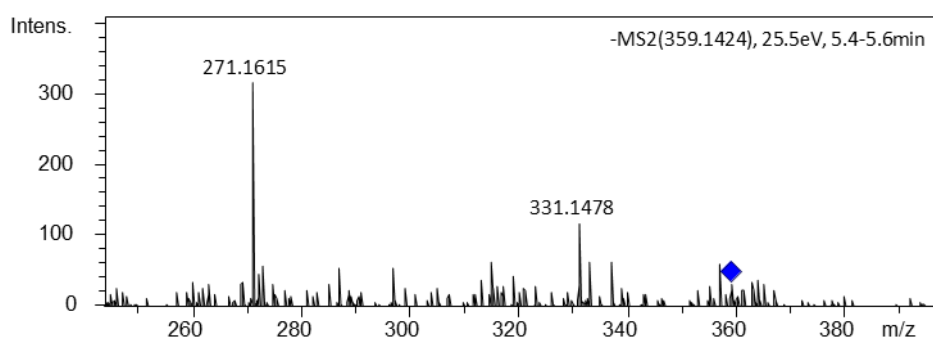
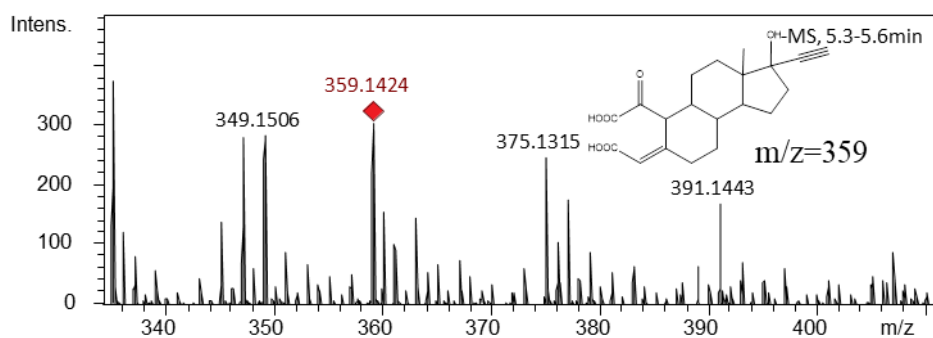
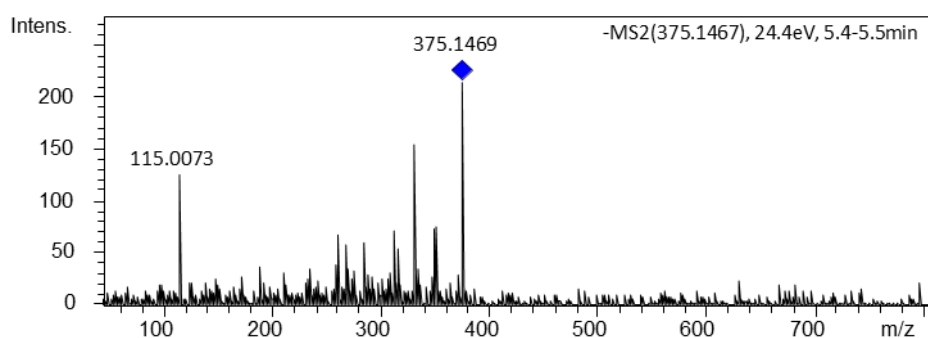
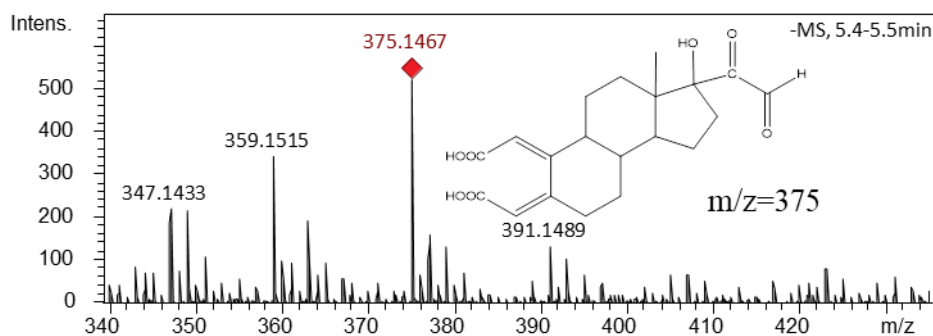


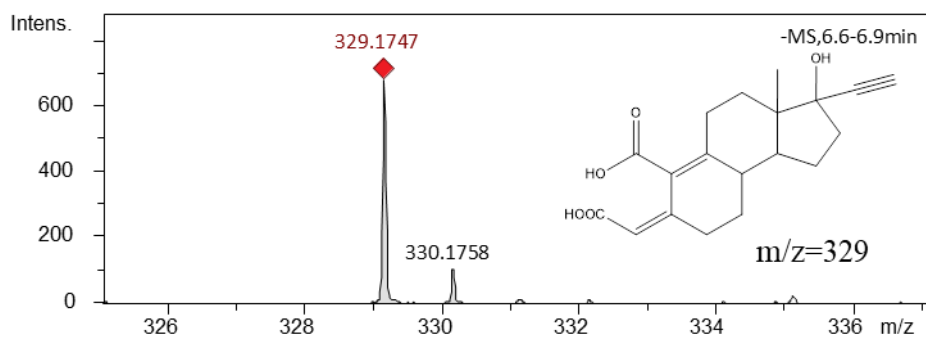
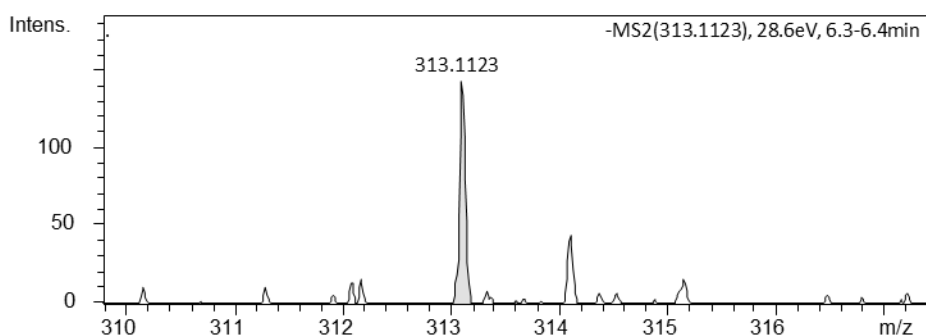
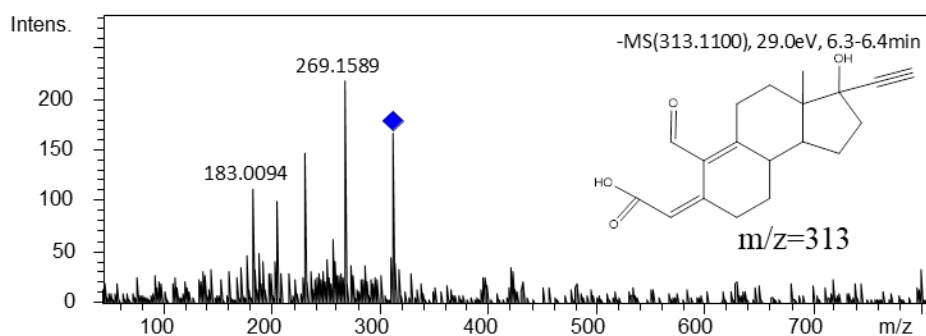
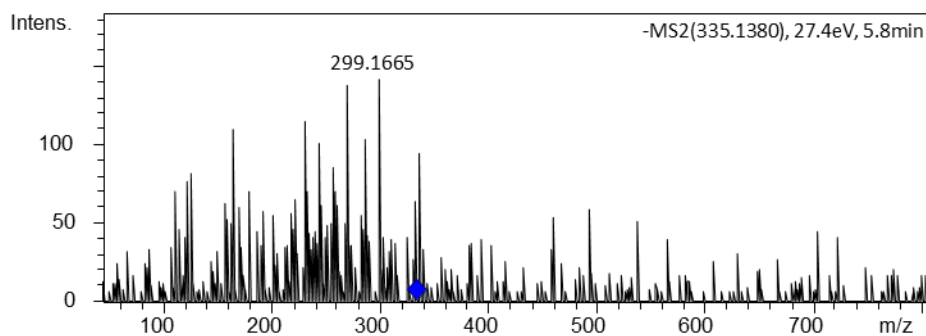
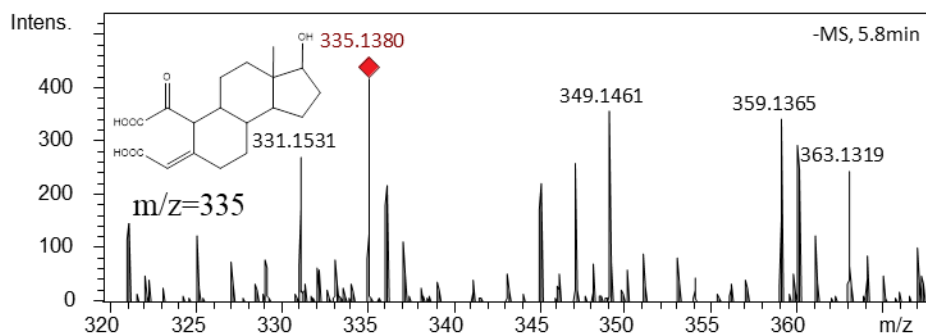


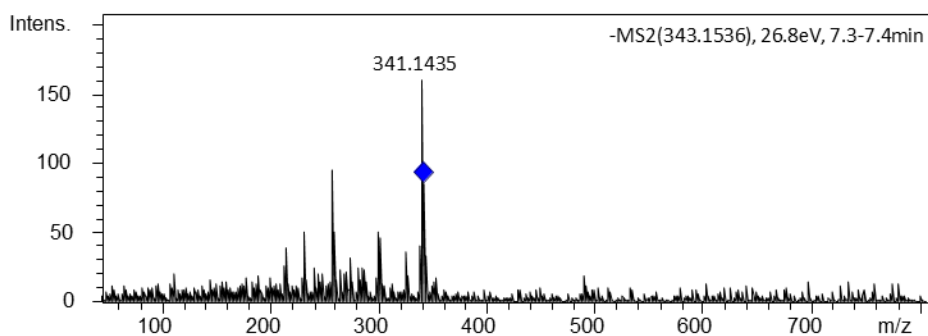
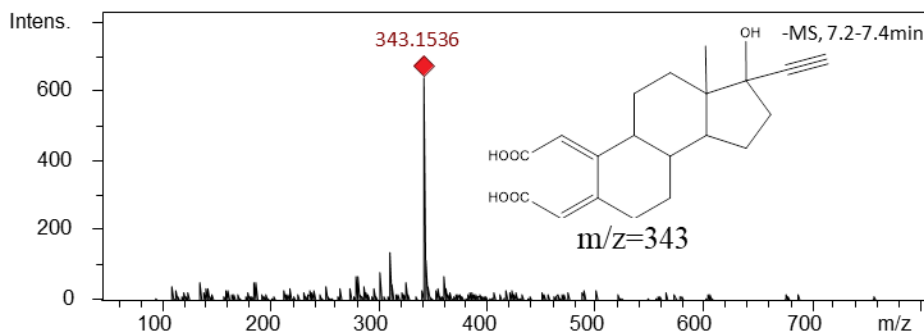
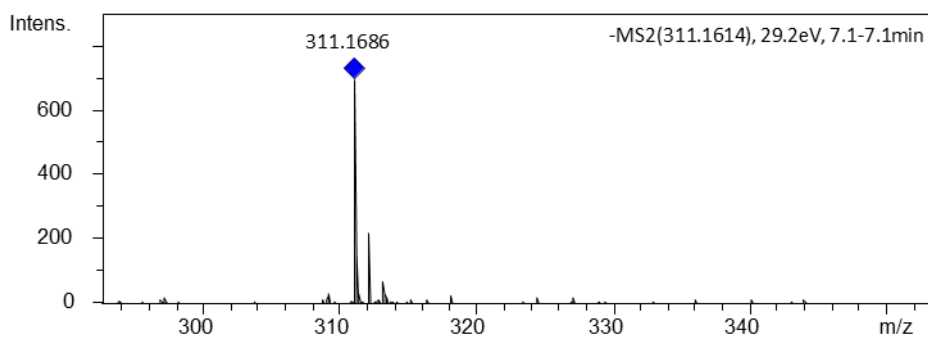
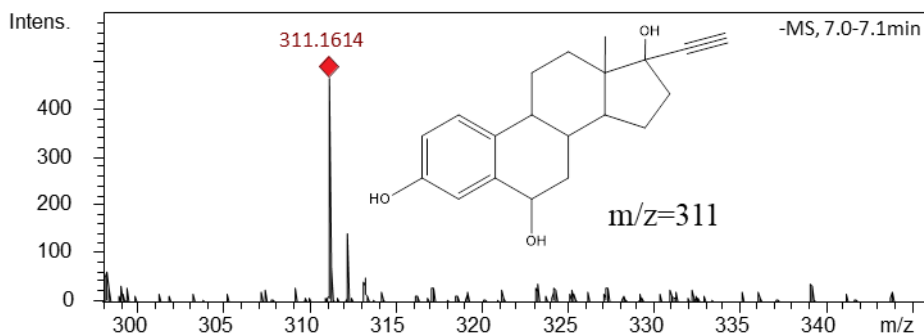
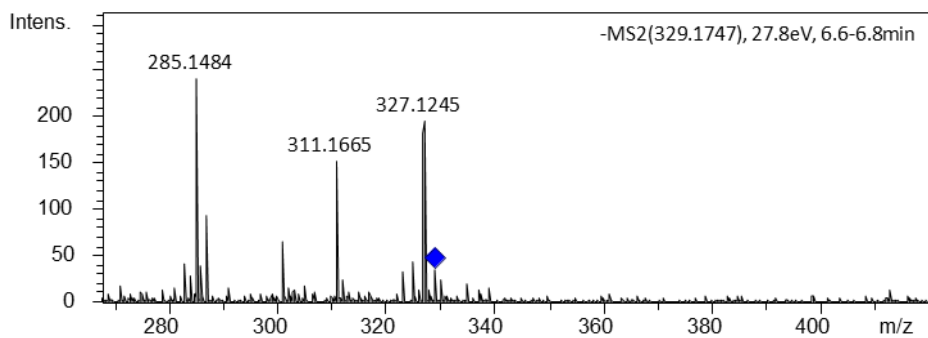


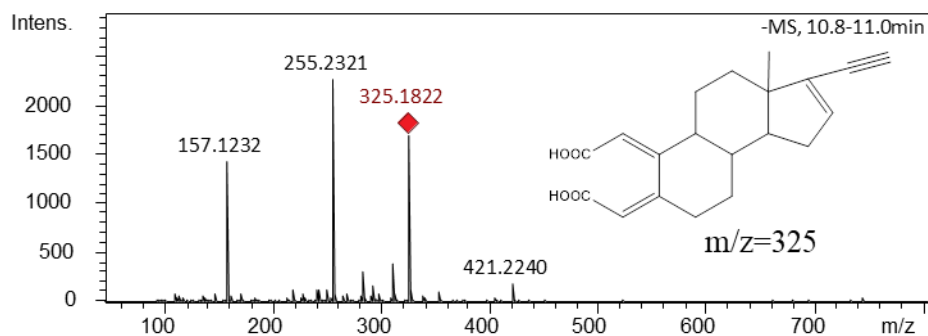
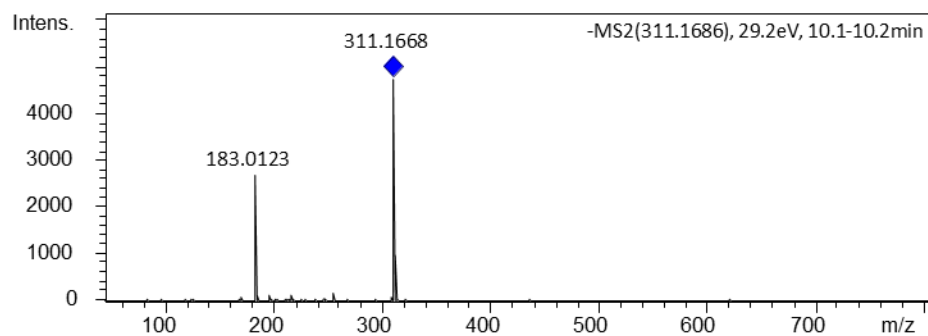
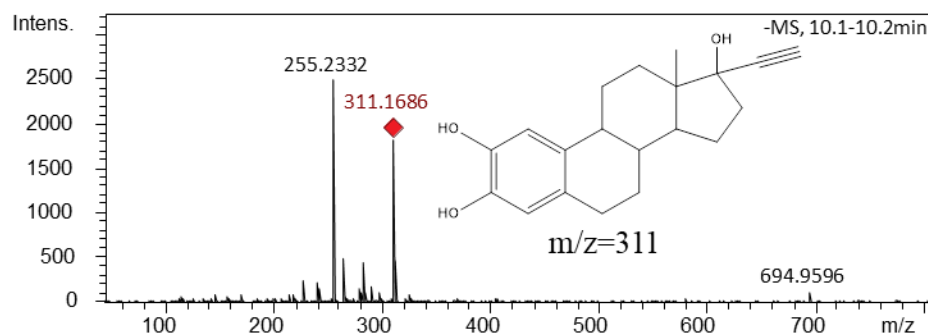
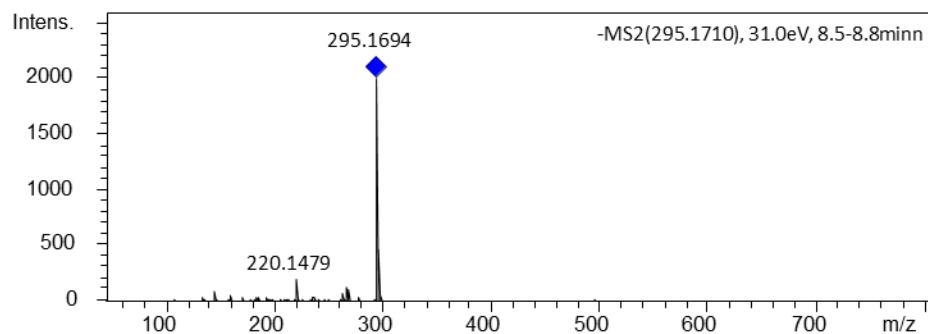
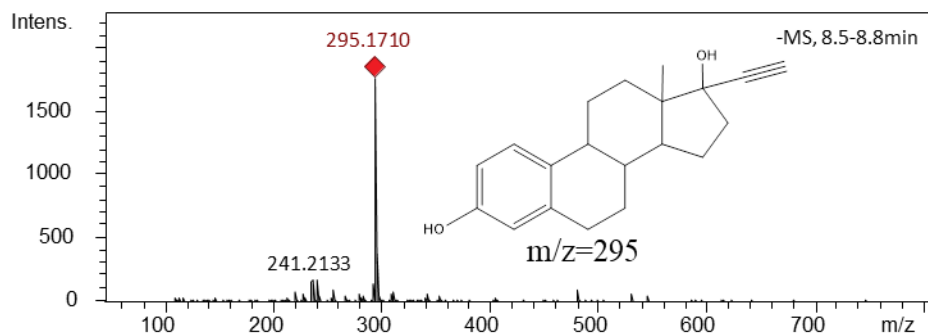


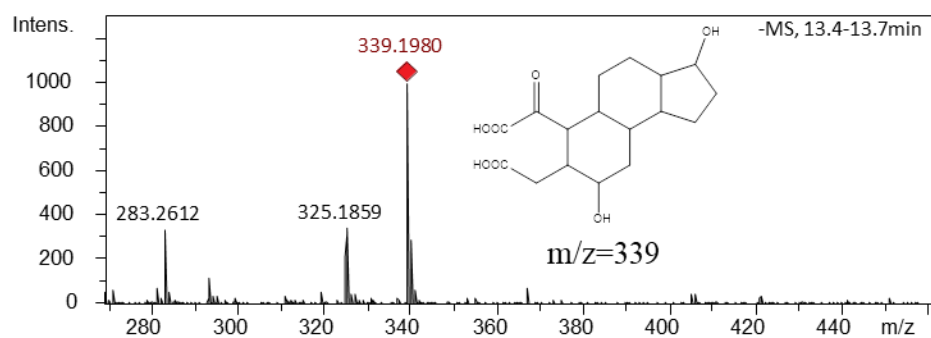
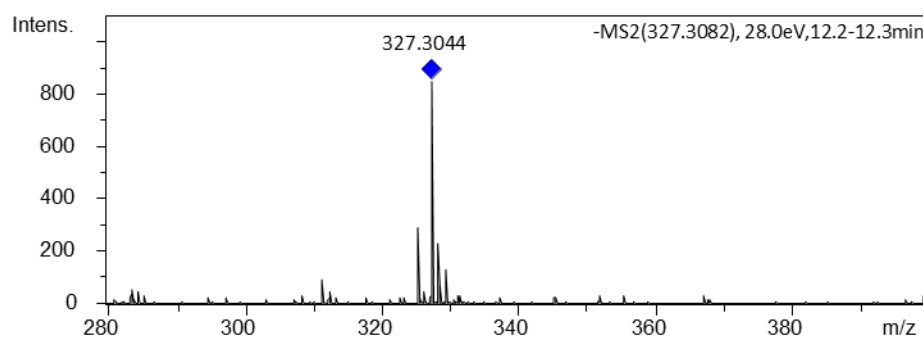
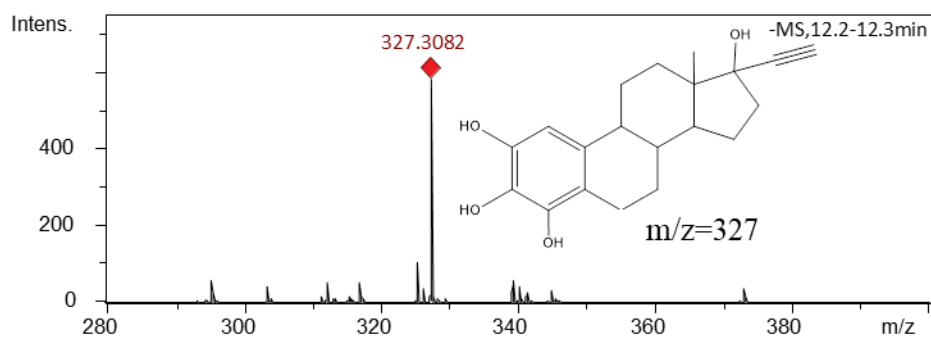
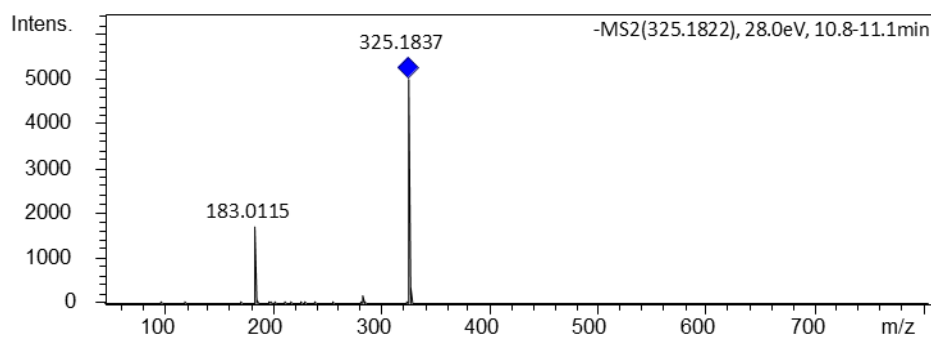
#### G.4 – Espectros de massa do EE2 e seus subprodutos gerados na foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>).

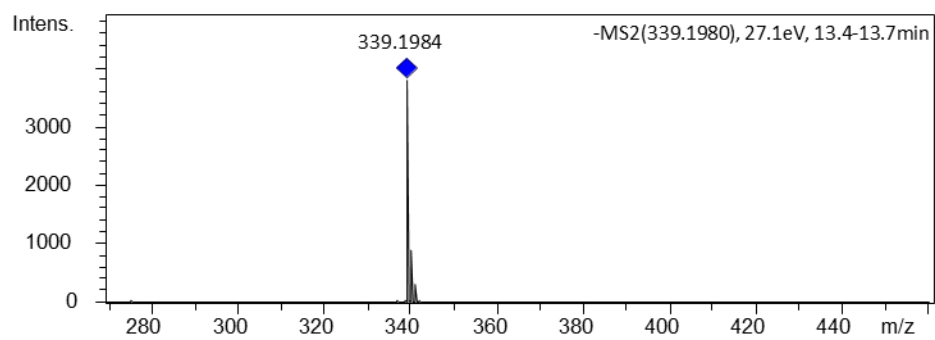




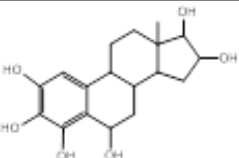
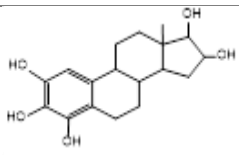
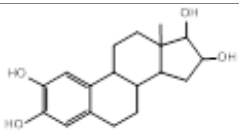
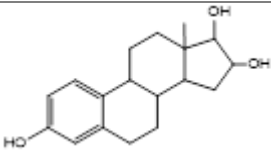
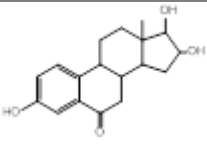
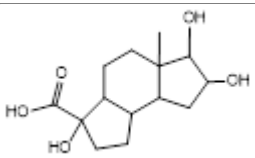
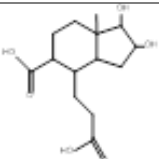




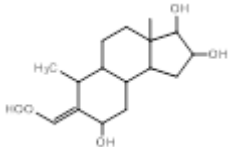
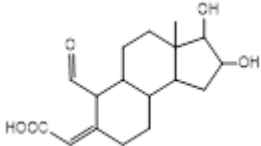
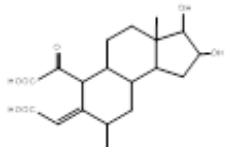
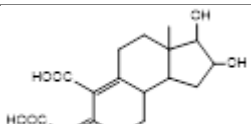
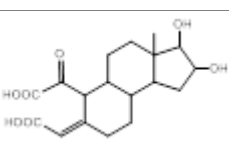
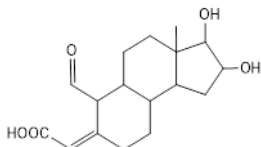




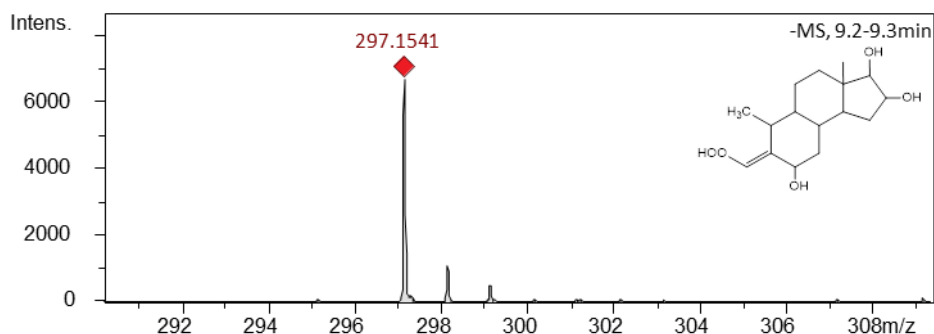
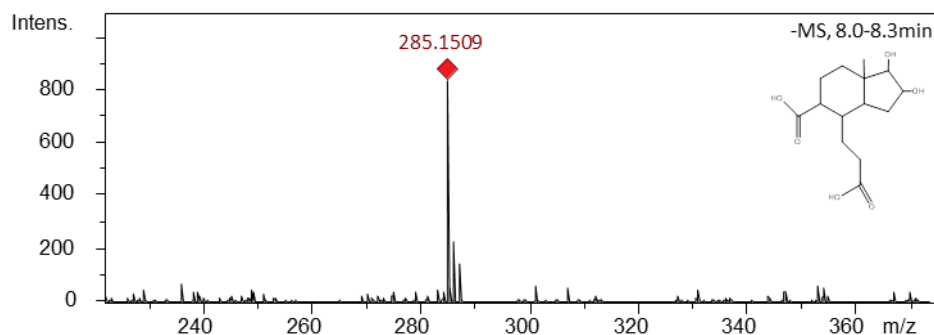
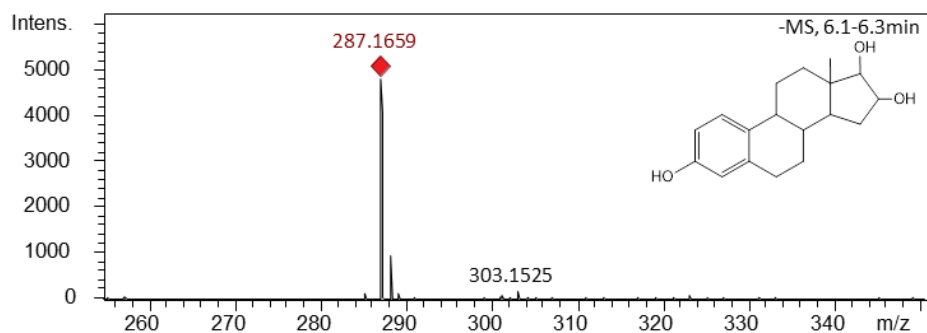
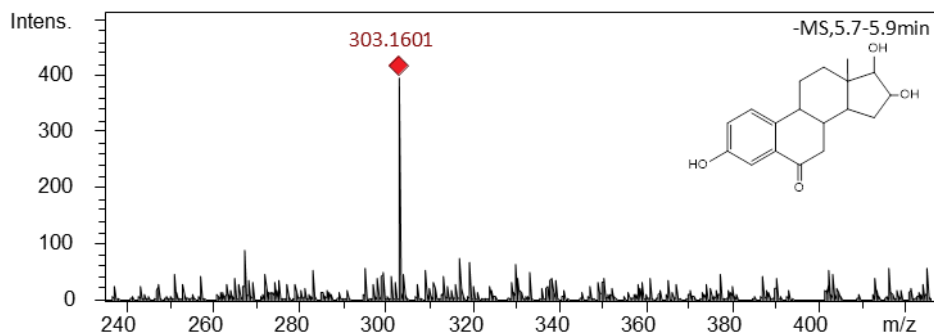
**APÊNDICE H** – Tabela dos produtos de transformação do E3 detectados nas reações UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> e UV/O<sub>3</sub> identificados por HPLC/ESI-QTOFMS em modo positivo [M-H]<sup>+1</sup> e negativo [M-H]<sup>-1</sup>.

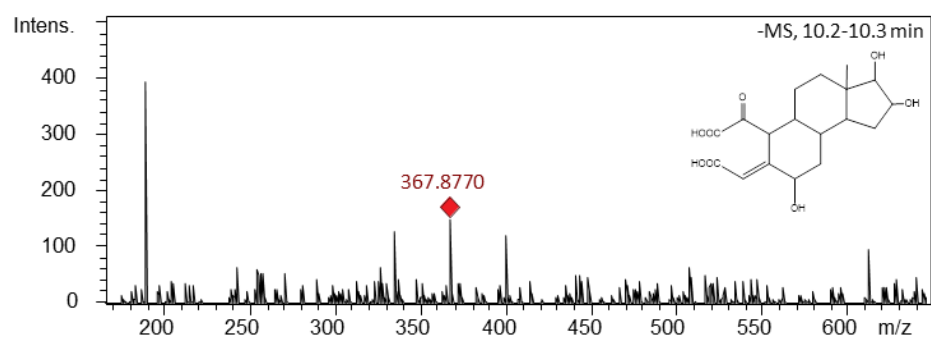
TP	RT (min)	Fórmula		Estrutura Proposta	Reação	Reference
		Molecular	m/z			
1	3.3	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	336		UV/TiO <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
2	5.1	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	320		UV/TiO <sub>2</sub>	Este estudo
3	5.7	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	304		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub>	(CHEN; ZHANG; ZUO, 2013)
4 (E3)	6.1	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	288		All	-
5	6.7	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	301		UV/TiO <sub>2</sub>	Este estudo
6	7.2	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	270		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
7	7.9	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	286		UV, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Este estudo



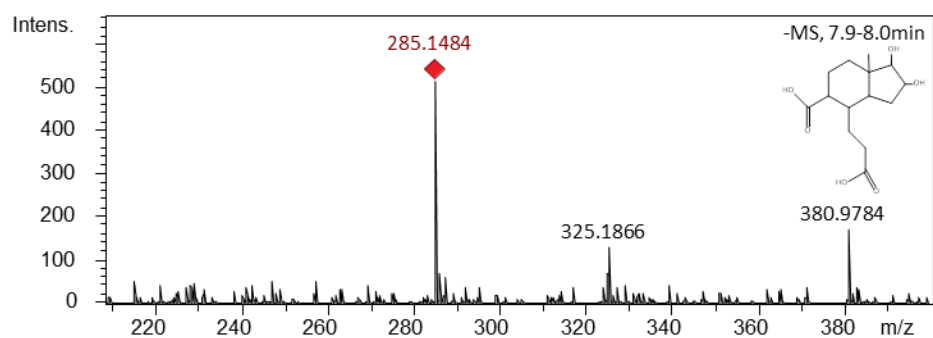
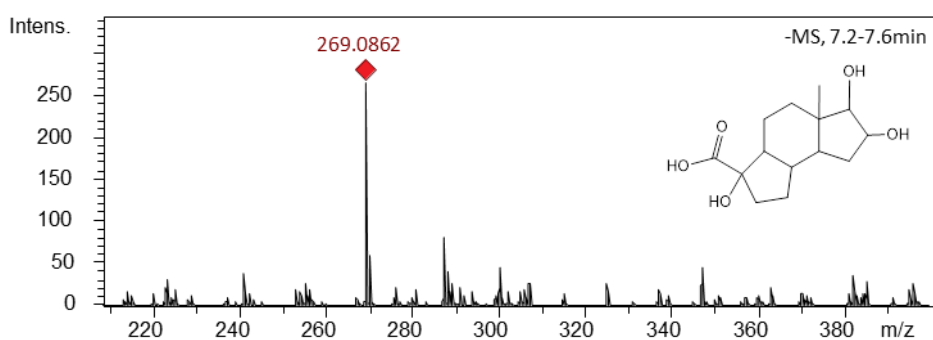
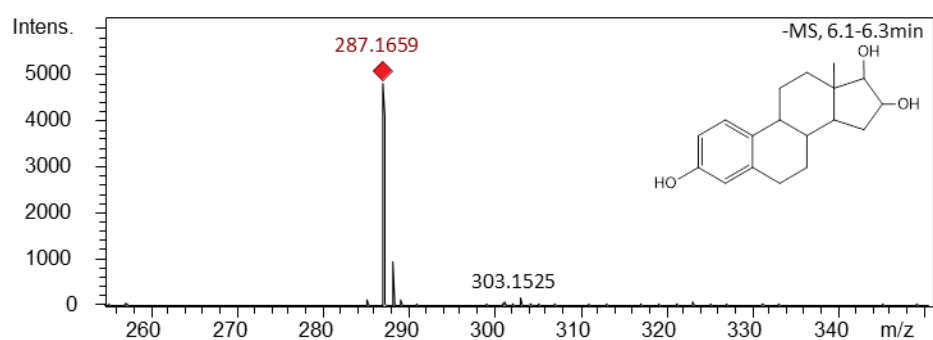
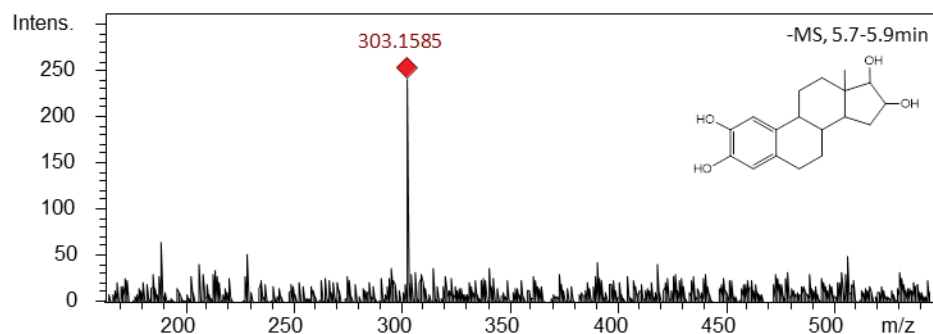
<b>8</b>	9.8	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	298		All	Este estudo
<b>9</b>	10	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	308		UV/TiO <sub>2</sub>	Este estudo
<b>10</b>	10.3	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	368		All	Este estudo
<b>11</b>	11.7	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	322		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , UV/TiO <sub>2</sub>	Este estudo
<b>12</b>	15.7	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	356		UV/O <sub>3</sub>	Este estudo
<b>13</b>	16.8	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	306		UV/O <sub>3</sub>	Este estudo

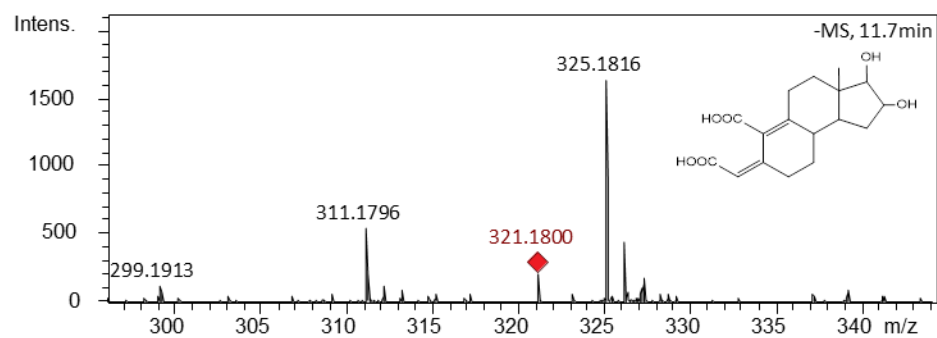
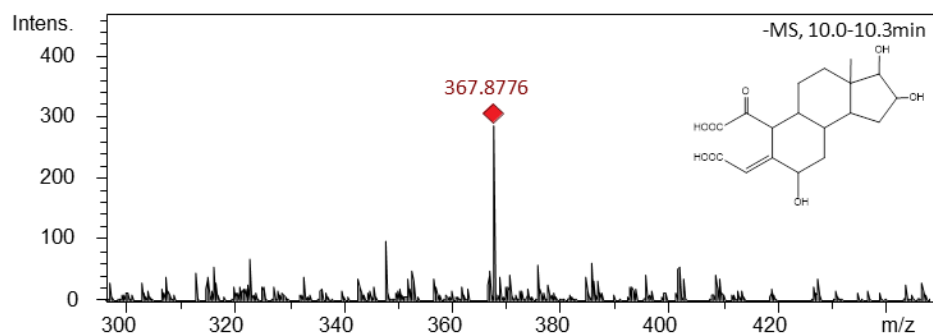
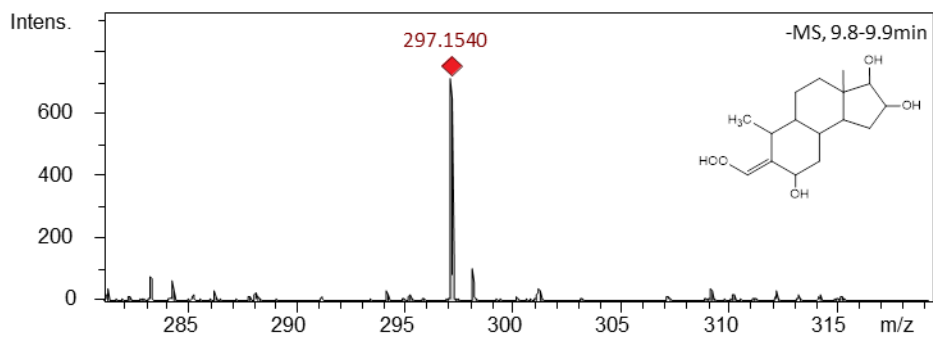
Nota: N.I.= número de identificação; TR= tempo de retenção.

**APÊNDICE I – Espectros de Massa (MS) do E3 e seus subprodutos.****I.1 – Espectros de massa do E3 e seus subprodutos gerados na fotólise (UV).**

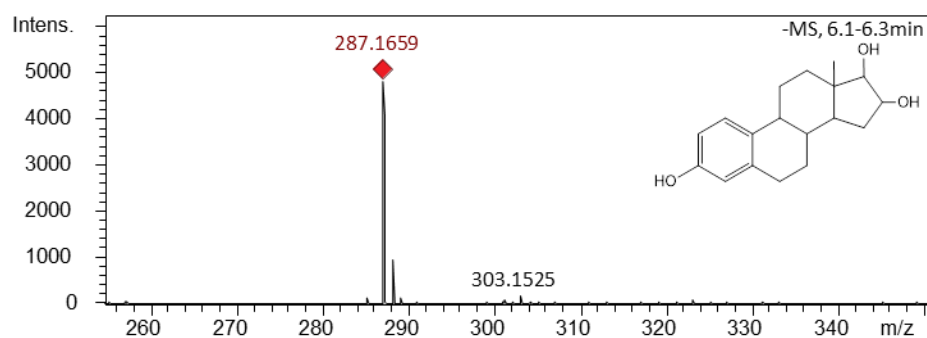
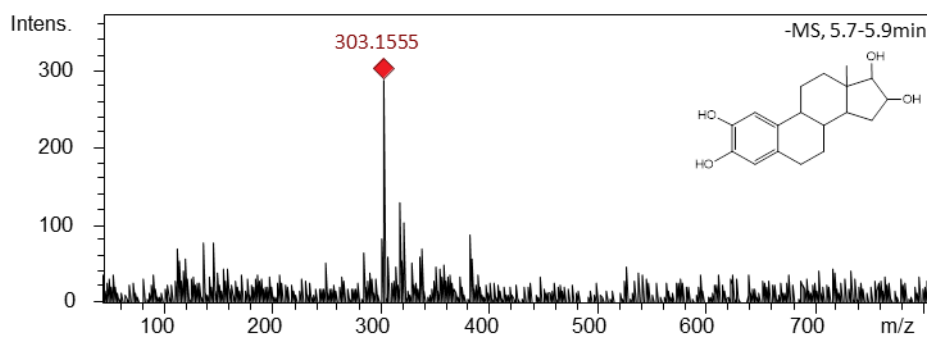
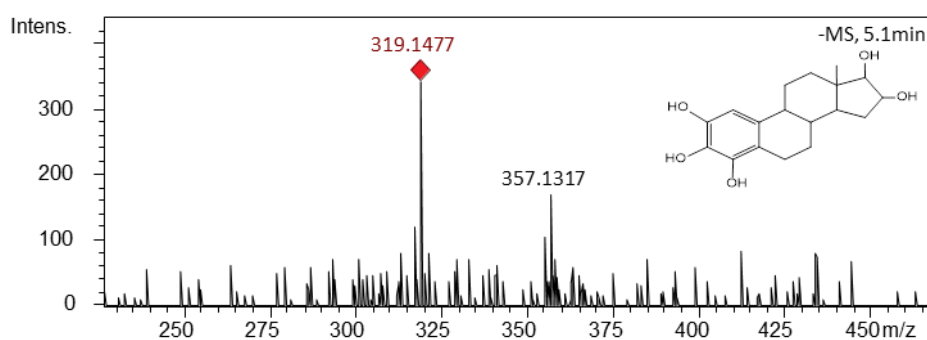
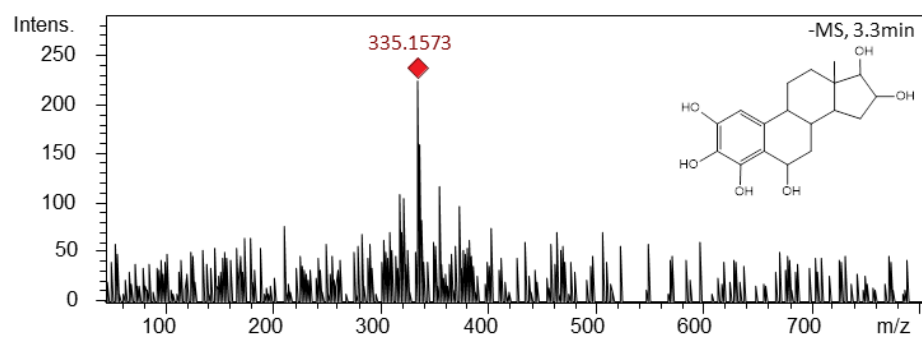


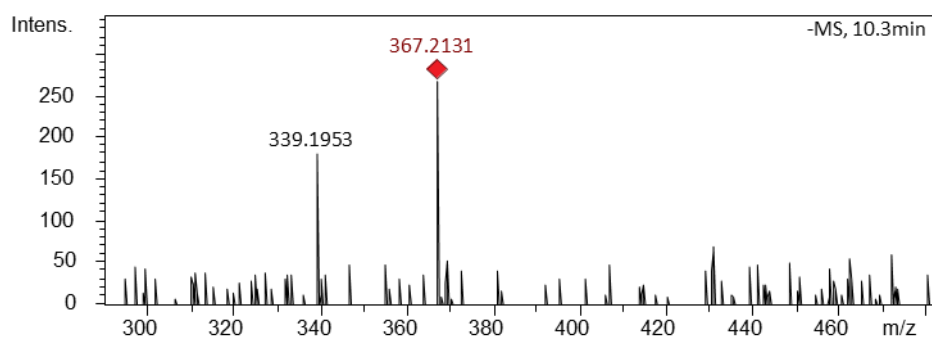
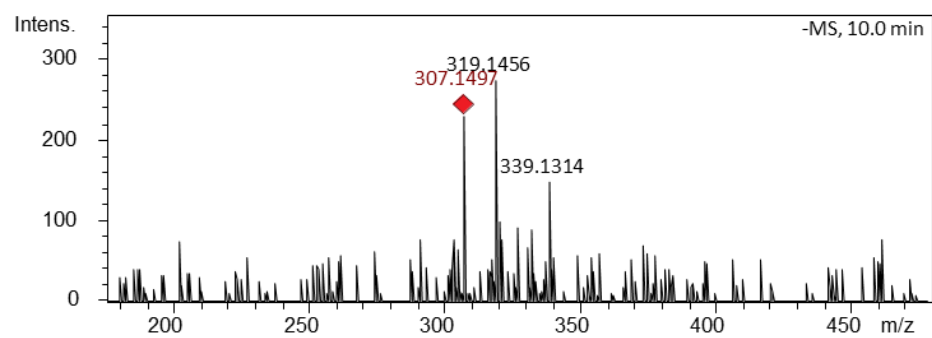
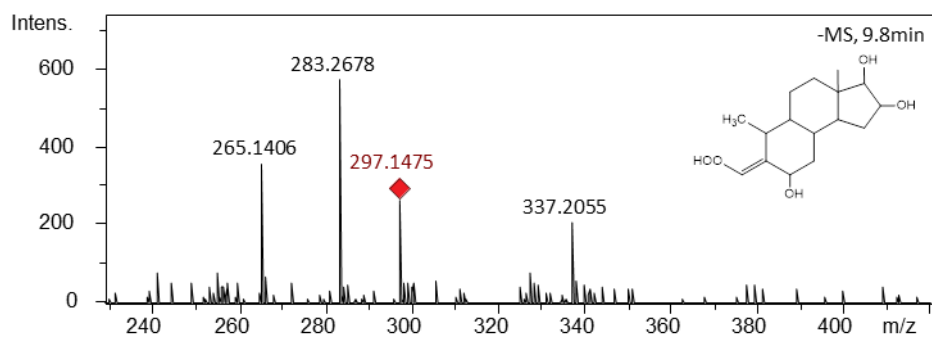
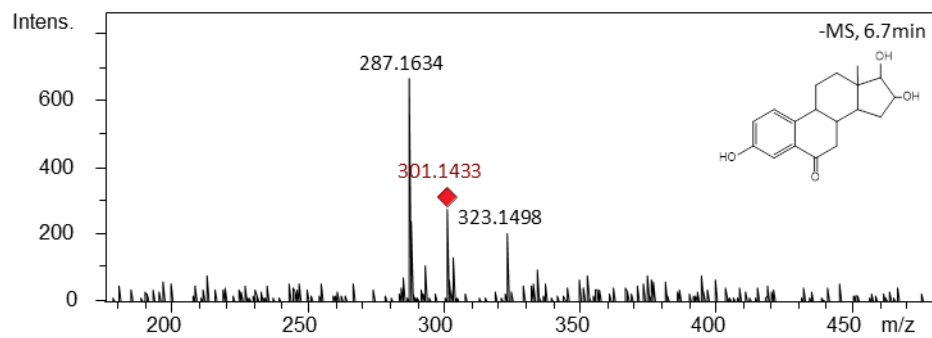
## I.2 – Espectros de massa do E3 e seus subprodutos gerados na foto-peroxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

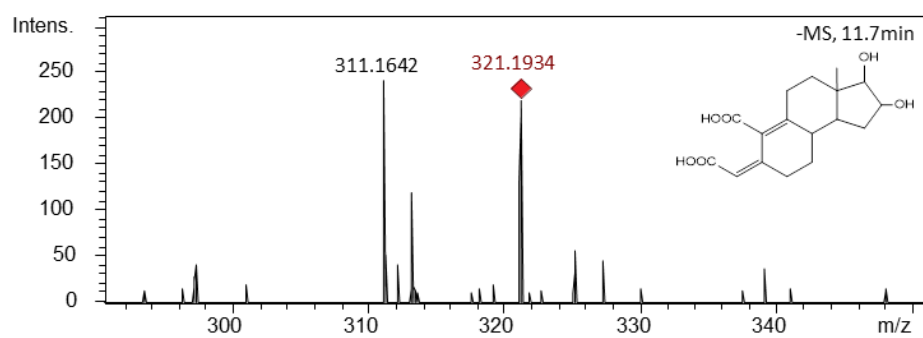




### I.3 – Espectros de massa do E3 e seus subprodutos gerados na fotocatalise (UV/TiO<sub>2</sub>).









#### I.4 – Espectros de massa do E3 e seus subprodutos gerados na foto-ozonização (UV/O<sub>3</sub>).

