UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

LARISSA LOUREIRO SALGUEIRO SILVA

UTILIZAÇÃO DE UV/H_2O_2 E OSMOSE INVERSA PARA REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS PRESENTES EM ESGOTO SANITÁRIO BIOTRATADO

RIO DE JANEIRO
2016

UTILIZAÇÃO DE UV/H_2O_2 E OSMOSE INVERSA PARA REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS PRESENTES EM ESGOTO SANITÁRIO BIOTRATADO

LARISSA LOUREIRO SALGUEIRO SILVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Fabiana Valéria da Fonseca, D Sc
Juacyara Carbonelli Campos, D Sc

Rio de Janeiro - RJ
Fevereiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

S586u

Silva, Larissa Loureiro Salgueiro
Utilização de UV/H2O2 e osmose inversa para remoção de estrogênios presentes em esgoto sanitário biotratado / Larissa Loureiro Salgueiro Silva. -- Rio de Janeiro, 2016.
162 f.

Orientadora: Fabiana Valeria Fonseca.
Coorientadora: Juacyara Carbonelli Campos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2016.

1. Micropoluentes. 2. Estrogênios. 3. Esgoto sanitário. 4. Osmose Inversa. 5. H2O2/UV. I. Fonseca, Fabiana Valeria, orient. II. Campos, Juacyara Carbonelli, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UTILIZAÇÃO DE UV/H_2O_2 E OSMOSE INVERSA PARA REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS PRESENTES EM ESGOTO SANITÁRIO BIOTRATADO

LARISSA LOUREIRO SALGUEIRO SILVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.).

Rio de Janeiro, 25 de Fevereiro de 2016.

_____

Profª. Fabiana Valéria da Fonseca, D. Sc. - EQ/UFRJ (Orientadora)

_____

Profª. Juacyara Carbonelli Campos, D. Sc. - EQ/UFRJ (Orientadora)

_____

Prof. Jose Carlos Mierzwa, D. Sc. - POLI/USP

_____

Profª. Daniele Maia Bila, D. Sc. - PEAMB/UERJ

_____

Profª. Magali Christe Cammarota, D. Sc. - EQ/UFRJ

Dedico cada etapa dessa dissertação a Deus, à minha mãe e ao meu irmão que sempre me incentivaram e proporcionaram um ambiente propício à dedicação total ao estudo.

AGRADECIMENTOS

Obrigada,

A Deus, por estar sempre em meu caminho através de seus intermediários;

A minha orientadora Fabiana V. Fonseca, por ter sido, além de professora desde a Monografia, uma mãe e amiga nas horas mais difíceis, por ter passado horas comigo ensinando a escrever e por sempre me incentivar a olhar o “copo meio cheio”;

A minha orientadora Juacyara C. Campos, por também, além de ter sido professora desde a graduação e IC, ser uma mãe e amiga, por sempre responder e-mails com diferenças de segundos e pela paciência na hora de me explicar os cálculos.

A professora Daniele M. Bila, que abriu as portas do Les para a realização do meu trabalho e por sua atenção e solicitude na condução dos experimentos.

A minha mãe Lia, pelo amor, compreensão, incentivo e subsídios dedicados. A sua paciência, destreza e resiliência para me ajudar nos momentos finais dessa dissertação, aturando minhas crises de choro e de labirintite.

Ao meu irmão, que sempre me incentivou com doces e refrigerantes, muito amor, nas noites em claro escrevendo, e nas horas de frustração após ensaios que deram errado.

A minha família, vovó Bahia, Sue, et al., que forneceram ambiente propício ao estudo.

Ao meu pai, que, embora distante, sempre perguntava como andava o mestrado e, quando podia, trazia mel.

Aos meus amigos do LabTare, Leandro, Mariana, Luiza, Débora, Carla, Jarina, Everton, Carolzinha, et al., que sempre me incentivaram, sem sucesso, a ir para o laboratório mais arrumadinha e por ouvirem minhas reclamações e choros diários. Ao meu estagiário Julinho, por me render horas na filtração.

Aos amigos do Les, Giselle, Mariana B., Flavia, Mariana L., Fernanda, Marcio, et al., que me receberam com todo carinho em seu ambiente e pelos lanchinhos ocorridos durante as invasões na UERJ.

Aos “Bons”, Monique, Juliana (Dani Clara), Nathalia, Luciano, Luciene e Suzi por me incentivarem desde a época de IC até o momento, com a passagem para o Doutorado. Em especial a Monique por estar ao meu lado nos momentos difíceis da vida.

A minha amiga Aline Marques, pelas fofocas e apoio diário mútuo na saga da defesa da dissertação.

E a todos que de alguma forma me apoiaram, rezaram, torceram e mandaram vibrações positivas para que esse sonho fosse realizado.

RESUMO

SILVA, Larissa Loureiro Salgueiro. Utilização de UV/H_2O_2 e Osmose Inversa para remoção de estrogênios presentes em esgoto sanitário biotratado. Orientadoras: Fabiana Valéria da Fonseca, D. Sc. / Juacyara Carbonelli Campos, D. Sc. Rio de Janeiro: ESCOLA DE QUÍMICA / UFRJ, 2016.

Os desreguladores endócrinos (DE), encontrados em esgotos sanitários, em concentrações traço, estão se consolidando como um novo desafio, pois são de difícil remoção e detecção. Neste trabalho foi estudada a remoção de 17β-estradiol (E2), 17α-etinilestradiol (EE2) e estriol (E3), bem como o efeito de atividade estrogênica, presentes em efluentes de Estação de Tratamento de Esgotos (ETE). Foi necessária a implantação e validação de metodologia analítica em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). O limite de detecção (E2 = 1,15; EE2 = 1,86 e E3 = 1,00) e de quantificação (E2 = 3,34; EE2 = 3,58; E3 = 3,50) ficou em concentrações de µg L^{-1}. Contudo, puderam-se quantificar concentrações em ng L^{-1} pelo emprego de cartuchos de extração em fase sólida. A análise de atividade estrogênica foi realizada pelo ensaio YES (*Yeast Estrogen Screem*). Os experimentos, em escala de bancada, baseou-se nos processos de separação por membranas, com Osmose Inversa (OI), e nos processos oxidativos avançados, UV/H_2O_2. Para a OI, realizou-se pré-tratamento, para a redução do *fouling* na OI, com membranas de microfiltração (MF). Variaram-se as recuperações de filtração (50, 60 e 70%), o volume de permeado (600 mL a 1750 mL) e a pressão de trabalho (10 e 20 bar). Assim, conseguiu-se atingir rejeições de 98 e 91 % de E2 e E3. A partir dos resultados, concluiu-se que o aumento da recuperação e do volume de permeação diminui a eficiência de rejeição dos hormônios e da estrogenicidade. A diminuição da pressão de trabalho não interferiu na rejeição. Para o sistema UV/H_2O_2, foi verificada a necessidade, também, de pré-tratamento por MF, para remoção de material particulado. A partir disso, foi realizado planejamento experimental do tipo fatorial, 2^2, com três pontos centrais. A melhor condição de remoção (abaixo do limite de detecção para E2 e EE2 e remoção de 90% para o E3) foi com a aplicação de 122,4 kJ m^{-2} de dose de UV e 4 mg L^{-1} de H_2O_2. Contudo, nesta condição, a atividade estrogênica mostrou-se elevada, o que indica o aparecimento de produtos de degradação mais estrogênicos que os anteriores. Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; Osmose Inversa; UV/H_2O_2; Tratamento de esgotos.

ABSTRACT

SILVA, Larissa Loureiro Salgueiro. Usage of UV/H_2O_2 and Reverse Osmosis to remove estrogens present in biotreated sewage. Advisors: Fabiana Valéria da Fonseca, D. Sc. / Juacyara Carbonelli Campos, D. Sc. Rio de Janeiro: ESCOLA DE QUÍMICA / UFRJ, 2016.

Endocrine disrupters (ED) found in sewage, in trace concentrations, are consolidating as a new challenge, because they are difficult to remove and detection. In this work the removal of 17β-estradiol (E2), 17α-ethinylestradiol (EE 2) and estriol (E3), as well as the estrogenic activity present in effluent of Wastewater Treatment Plant (WWTP). Implementation and validation of analytical methodology in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was required. The detection limit (E2 = 1.15; = 1.86 EE2 and E3 = 1.00) and quantification (E2 = 3.34; EE2 = 3.58; E3 = 3.50) was in concentrations around µg L^{-1}. However, it could be quantified concentrations in ng L^{-1} by employing solid phase extraction cartridges. The estrogenic activity analysis was performed by the YES assay (Yeast Estrogen Screem). Experiments in bench scale was based on membrane technology with reverse osmosis (RO), and advanced oxidation processes, UV/H_2O_2. In order to reduce fouling, a pretreatment with microfiltration membranes (MF) was conducted. Filtration ecoveries (50, 60 and 70%), permeate volume (600 mL to 1750 mL) and working pressure (10 and 20 bar) was varied. Thus, it was possible to achieve rejections of 98 and 91% of E2 and E3. From the results, it was concluded that the increase in recovery and permeation volume decreases the rejection efficiency of hormones and estrogenicity. The decrease in operating pressure did not affect the rejection. The system of UV/H_2O_2 was verified also a pretreatment with MF to remove particulates. Thus, it was performed an experimental design with factorial 2^2, with three central points. The better removal condition (below the detection limit for E2 and EE2 and removal of 90% for E3) was achieved by the application of 122.4 kJ m^2 UV dose and 4 mg L^{-1} of H_2O_2. However, in this condition, the estrogenic activity was high, which indicates the presence of degradation products that are more estrogenic than before. Keywords: endocrine disruptors; Reverse Osmosis; UV / H2O2; Sewage treatment.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 18

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20

2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS 20

2.1.1 Definição 20

2.1.2 Substâncias consideradas desreguladores endócrinos 21

2.1.2.1 Hormônios 21

2.1.3 Efeitos causados pela exposição aos DE 27

2.1.4 Metodologias para análise de atividade estrogênica 28

2.1.4.1 Yeast Estrogen Screen (YES) 30

2.1.5 Métodos analíticos para quantificação de estrogênios 33

2.1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 38

2.1.6 Extração em Fase Sólida (EFS) 41

2.1.7 Presença de desreguladores endócrinos em esgoto sanitário 43

2.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM) 51

2.2.1 Tipos de membranas 52

2.2.1.1 Estruturas das membranas 52

2.2.1.2 Força Motriz 54

2.2.1.3 Mecanismos de separação 55

2.2.2 Tipo de processo 56

2.2.3 Osmose Inversa 58

2.2.4 Emprego de Osmose inversa para remoção de micropoluentes em esgotos sanitários 61

2.3 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS 70

2.3.1 UV/H_2O_2 75

2.3.1.1 Variáveis operacionais 75

2.3.2 Emprego de UV/H_2O_2 para remoção de micropoluentes em esgotos sanitários 77

3 MATERIAIS E MÉTODOS 81

3.1 REAGENTES 81
3.2 MATRIZ AVALIADA 83
3.3 LIMPEZA DAS VIDRARIAS 83
3.4 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS 84
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS 86
3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 87
3.5.2 Ensaio YES 90
3.5.2.1 Preparo do meio de análise 90
3.5.2.2 Preparo das microplacas de 96 poços 91

3.6 SISTEMA DE SEPARAÇÃO POR OSMOSE INVERSA 93
3.7 PROCESSO OXIDATIVO UV/H_2O_2 96

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 99

4.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA 99
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESGOTO BIOTRATADO DA ETE 103
4.3 REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS POR OSMOSE INVERSA 104
4.3.1 Caracterização da membrana de OI 104
4.3.2 Influência do pH na remoção de estrogênios em solução sintética de água ultrapura 105
4.3.3 Influência da recuperação 108
4.3.4 Influência do volume de permeação 114
4.3.5 Influência da Pressão de operação 116
4.3.6 Rejeição de Aromáticos e Condutividade 117

4.4 REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS POR UV/H2O2 118

5 CONCLUSÕES 129

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 130

REFERÊNCIAS 131

ANEXO I 148

APÊNDICE I 151

APÊNDICE II **154**

APÊNDICE III **155**

APÊNDICE IV **159**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Processo de desregulação endócrina (a) resposta natural (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista (Adaptado de BIRKETT e LESTER, 2003).....23
Figura 2. Estrutura química do E2, E3 e EE2.....24
Figura 3. Biossíntese dos estrogênios Estrona, E2 e E3 (BILA, 2005).....26
Figura 4. Ilustração da expressão da indução estrogênica por células de levedura (1) e (2) expressão do REh no plasmídeo, (3) ativação do receptor (4) expressão de *lac*-Z, (5) produção da β-Galactosidase, (6) mudança de coloração de amarelo para rosa (Adaptado de ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).....31
Figura 5. Microplaca de 96 poços. Linhas (A) e (B) referem à amostra ambiental; (E) e (F) ao padrão E2 como controle positivo e (C), (D), (F) e (H) como controle negativo sem a amostra. (Fonte: Autor).....33
Figura 6. Diferença entre cromatogramas com vazão isocrática (A) e gradiente (B) (STAFIEJ, PYRZYNSKA e REGAN, 2007) 39
Figura 7. Equipamento básico de CLAE: (a) reservatório das fases móveis; (b) bomba de alta pressão; (c) válvula de injeção; (d) coluna cromatográfica; (e) detector e (f) registrador (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998).....40
Figura 8. EFS para retenção do analito (Adaptado de SCHÜßELER, 2016).....41
Figura 9. EFS para retenção de interferentes (Adaptado de SCHÜßELER, 2016).....42
Figura 10. Rotas de acumulação e transformação de micropoluentes no ambiente (SOUZA, 2011).....44
Figura 11. Correntes presentes nos PSM (Fonte: Autor) 56
Figura 12. Esquema do fenômeno osmótico e da OI (Adaptado de NOBLE e STERN, 1999) 59
Figura 13. Mecanismos de retenção de micropoluentes em membranas poliméricas: (A) Exclusão por tamanho; (B) Exclusão por carga; (C) Adsorção; (D) Difusão; (E) Interações soluto-soluto; (F) Fouling (Adaptado de SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011).....69
Figura 14. Esquema detalhado de todas as atividades realizadas.....82
Figura 15. Aparelho de CLAE, marca Breeze 2 fabricado pela Water's Corporation®, utilizado dos testes analíticos. (A) Amostrador automático; (B) Fase móvel; (C) Bomba, misturador e degaseificador; (D) Detector de DAD-UV; (E) Detector de Fluorescência; (F) Coluna cromatográfica. 87

Figura 16. Esquema de uma microplaca de 96 poços. Linhas A e C referentes ao E2, E e G às amostras e B, D, F e H aos brancos (SILVA, 2015).....92
Figura 17. Sistema *dead-end* para PSM com membranas de MF e OI. 94
Figura 18. Espaçador de aço-inox entre a membrana e a barra magnética. 94
Figura 19. Esquema do PSM, no qual são indicados os pontos de amostragem: (a) saída do decantador secundário, (b) permeado da MF, (c) permeado da OI e (d) concentrado da OI ...96
Figura 20. Esquema do POA, nos quais são mostrados os pontos de amostragem: (a) saída do decantador secundário; (b) amostra tratada pelo POA sem pré-tratamento; (c) permeado da MF; (d) amostra tratada pelo POA com pré-tratamento.....98
Figura 21. Cromatogramas da curva padrão contendo E2, EE2 e E3 a concentrações de aproximadamente 50, 25, 10, 6, 3 µg L^{-1}.....100
Figura 22. Cromatogramas do teste de recuperação para concentrações 20, 50 e 100 ng L^{-1}. 102
Figura 23. Cromatogramas do teste de recuperação, considerando o efeito matriz, para concentrações de 20, 50, e 100 ng L^{-1}. 102
Figura 24. Relação fluxo/tempo para diferentes pressões em água ultrapura (7, 10, 12, 15 bar) e água salobra (20 bar).....105
Figura 25. Rejeição de E2, EE2 e E3 em água sintética em pH 5 e 11 106
Figura 26. Rejeição de E2, EE2 e E3 pela aplicação de OI em recuperações de 50, 60 e 70%. *Calculado utilizando-se o valor de LQ, pois o mesmo apresenta valor < LQ.....108
Figura 27. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 50%.....112
Figura 28. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 60%.....112
Figura 29. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 70%.....113
Figura 30. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 70% a volumes menores. 115
Figura 31. Ensaio YES para diferenciação de membrana de OI nova e usada.....115
Figura 32. Rejeição em termos de Absorbância (254 nm) e condutividade para amostra de esgoto biotratado por processo de OI com recuperações de 50, 60 e 70%, bem como as amostras obtidas com volumes menores de permeação em 20 e 10 bar para recuperações de 70% (70%* 70%**, respectivamente).....118
Figura 33. Remoção de EE2, E3 e Eq-E após diferentes doses de UV em concentração definida de H_2O_2 (18.8 mg L^{-1}). 120

Figura 34. Curvas dose-resposta para amostras de Efluente da ETE e após a aplicação de UV/H_2O_2 para os tempos de 1, 5, 3 e 10 horas, referentes às doses de UV de 24,48, 73,44, 122,4, 244,8 kJ m^{-2}. 120
Figura 35. Curvas dose-respota dos experimentos do planejamento experimental, incluindo o permeado da MF. 124
Figura 36. Gráfico 3D que relaciona a dose de UV e a concentração de H_2O_2 e de E2. 125
Figura 37. Gráfico 3D que relaciona a dose de UV e a concentração de H_2O_2 e de EE2. 126
Figura 38. Gráfico 3D que relaciona a dose de UV e a concentração de H_2O_2 e de E3. 126
Figura 39. Curva de calibração para o E2. 151
Figura 40. Curva de calibração para o EE2. 152
Figura 41. Curva de calibração para o E3 153
Figura 42. Cromatograma referente a amostra do permeado da OI na recuperação de 70% . 154
Figura 43. Relação tempo x fluxo para diferentes pressões em água ultra pura (7, 10, 12, 15 bar) e água salobra (20 bar). 155
Figura 44. Placa de 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra de efluente de ETE; (b) Fileiras E e G permeado da MF para as recuperações de 50 e 60%, bem como para a de 70% com volumes menores 155
Figura 45. Placa 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do permeado da MF para recuperação de 70% na OI; (b) Fileiras E e G amostra do permeado da OI para recuperação de 70% 156
Figura 46. Placa de 96 poços para ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do concentrado da OI para recuperação de 70%; (b) Fileiras E e G curva padrão do E2 156
Figura 47. Placa 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do permeado da OI para recuperação de 50%; (b) Fileiras E e G amostra do concentrado da OI para recuperação de 50%. 157
Figura 48. Placa de 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do permeado da OI para recuperação de 60%; (b) Fileiras E e G amostra do concentrado da OI para recuperação de 60% 157
Figura 49. Placa de 96 poços do ensaio YES: Fileiras E e G amostra do permeado da OI para recuperação de 70% com volumes menores. 158
Figura 50. Gráfico de Pareto para os resultados de concentração de E2 159
Figura 51. Gráfico de Pareto para os resultados de concentração de EE2 159
Figura 52. Gráfico de Pareto para os resultados de concentração de E3. 160

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Categorias de diversas substâncias estrogênicas consideradas DE (Adaptado de LIU, KANJO e MIZUTANI, 2009) 23
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos estrogênios E2, EE2 e E3 (LIU, KANJO e MIZUTANI, 2009) 25
Tabela 3. Concentração de E2 no sangue em diferentes populações (Adaptado de Wenzel, Müllere Ternes, 2003) 25
Tabela 4. Objetivos dos principais testes *in vitro*. 29
Tabela 5. Potencial Estrogênico de diferentes hormônios obtidos pelos ensaios de YES e E-screen (Adaptado de LIU, KANJO e MIZUTANI, 2009) 30
Tabela 6. Classificação dos métodos cromatográficos em coluna (Adaptado de SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001) 34
Tabela 7. Relação de Trabalhos que empregaram diversos tipos de cromatografia para análise de estrogênios em matrizes distintas, bem como o limite de detecção do método. 35
Tabela 8. Presença de DE em afluente e efluente de ETE em diversos países/regiões. 45
Tabela 9. Estimativa da excreção diária em µg de E2, E3 e dos estrogênios em geral, para crianças, homens, mulheres, mulheres grávidas e mulheres na menopausa 50
Tabela 10. Estimativa da concentração de estrogênios em esgoto sanitário a partir da carga anual lançada por homens acima de 12 anos, mulheres entre 12 e 49 anos e mulheres acima de 49 anos 50
Tabela 11. Materiais utilizados na fabricação de membranas para diversos processos de separação (Adaptado de Nath, 2008). 54
Tabela 12. Principais aplicações de membranas de OI (Adaptado de LI, FANE, *et al.*, 2008) 59
Tabela 13. Relação de trabalhos que abordam a remoção de micropoluentes, presentes em esgotos, por PSM 62
Tabela 14. Espécies oxidativas e seus respectivos potenciais de oxidação (MUNTER, 2001). 71
Tabela 15. Constante da taxa de oxidação de radicais hidroxila com compostos orgânicos específicos (Adaptado de The UV/Oxidation Handbook, 1994). 71
Tabela 16. Breve descrição dos POAs mais empregados na literatura (USEPA, 1998; KOMMINENI, ZOECKLER, *et al.*, 2000; POURAN, AZIZ e DAUD, 2015) 73
Tabela 17. Valores mínimos de DQO, Alcalinidade, pH, SST e Ferro que deve conter um afluente de UV/H_2O_2. 77

Tabela 18. Relação de trabalhos que abordam a remoção de micropoluentes presentes em efluente de ETE, por UV/H_2O_2.....79
Tabela 19. Métodos, Equipamentos e laboratórios para a realização dos parâmetros físico/químicos. 86
Tabela 20. Metodologia baseada em modo gradiente: variação de solventes (ACN e $H_2O_{ultra-pura}$) com o tempo. 88
Tabela 21. Concentrações teóricas de E2, EE2 e E3 para construção da curva de calibração.89
Tabela 22. Concentrações dos padrões de E2, EE2 e E3 nas amostras de efluente de ETE para os testes de recuperação e seletividade.....89
Tabela 23. Valores efetivos e codificados para planejamento experimental.....97
Tabela 24. Equação da reta, R, R^2 e LD e LQ para os três estrogênios obtidos em uma mesma corrida cromatográfica.....99
Tabela 25. Recuperações atingidas a partir de seis concentrações diferentes do padrão. 100
Tabela 26. Parâmetros físico-químicos (COT e Abs_{254}) e concentrações de E2, EE2 e E3, referentes a nove coletas de esgoto biotratado de ETE, durante os meses de Junho à Dezembro de 2015. 103
Tabela 27. Concentrações dos estrogênios nas amostras de solução sintética antes e após a permeação pela OI (entrada, permeado e concentrado) em pH 5 e 11.....107
Tabela 28. Concentração das amostras de esgoto biotratado após os PSM (Permeado da MF, permeado da OI e Concentrado da OI).....111
Tabela 29. Resultados de Eq-E para as amostras de permeado da MF e OI e concentrado da OI para recuperações de 50, 60 e 70%. 113
Tabela 30. Concentração de E2, EE2 e E3 nos permeados da MF e OI, em volumes menores, bem como as rejeições atingidas. 116
Tabela 31. Concentração dos estrogênios após diferentes doses de UV em concentração definida de H_2O_2 (18,8 mg L^{-1}). 119
Tabela 32. Planejamento experimental com os valores codificados e concentração dos estrogênios, TOC, Abs_{254} e H_2O_2 residual após UV/H_2O_2.....122
Tabela 33. Equação da reta (em fatores codificados), R^2 e R obtidos a partir do planejamento experimental. 127

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
BRM	Bioreator de Membranas
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNRH	Conselho Nacional de Recursos Hídricos
DE	Desreguladores Endócrinos
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E_0	Potencial de Oxidação
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EE2	17α-Etinilestradiol
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de Massas
Eq-E	Equivalente a concentração de E2
E-screen	Ensaio com células de levedura
ETA	Estação de Tratamento de Águas
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
EtOH	Etanol
FLU	Fluorescência
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
J	Fluxo de Permeado
LD	Limite de Detecção
Log K_{ow}	Hidrofobicidade
LQ	Limite de Quantificação
MF	Microfiltração
NF	Nanofiltração
$\cdot OH$	Radical Hidroxil
O_2	Oxigênio
O_3	Ozônio
OI	Osmose Inversa
P	Permeabilidade
POA	Processos Oxidativos Avançados
PSC	Processos de Separação Convencionais
PSM	Processos de Separação por Membranas
R_{ec}	Grau de Recuperação
R_{ej}	Taxa de Rejeição
REh	Receptores de Estrogênio humano
SST	Sólidos Suspensos Totais
USEPA	*United State Environmental Protection Agency*
UF	Ultrafiltração
UV	Ultravioleta
YES	*Yeast Estrogen Screen*

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Ao longo das últimas décadas, a presença de algumas substâncias no ambiente aquático capazes de causar danos à saúde dos seres humanos e animais, tem gerado grande preocupação ambiental. Muitas destas substâncias são identificadas como desreguladores endócrinos (DE) e estão presentes nos efluentes industriais e doméstico em concentrações variando de $\mu g\ L^{-1}$ a $ng\ L^{-1}$. Fazem parte dessas substâncias os produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, hormônios esteróides, substâncias químicas industriais, pesticidas e muitos outros compostos.

Diversos autores investigaram o efeito destas substâncias no ambiente aquático e observaram danos à saúde humana e de animais, como o desenvolvimento de câncer, redução na quantidade de esperma, endometriose, entre outros (BIRKETT e LESTER, 2003). Além disso, não há somente o impacto do DE sozinho, existe também o efeito sinérgico que pode acontecer na presença de duas ou mais substâncias (LUO, GUO, *et al.*, 2014).

A frequência dos DE no ambiente aquático tem sido associada a diversos danos, a curto e a longo prazo, bem como à resistência dos microrganismos aos antibióticos, por exemplo. Contudo, por estarem presentes em concentrações tão pequenas, os métodos de detecção e análise nem sempre são precisos, criando um desafio para os processos de tratamento de águas residuárias (BILA e DEZOTTI, 2003).

As tecnologias utilizadas nas Estações de Tratamento de Águas (ETA) e Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) não são efetivas na remoção desses micropoluentes e seus efeitos, pois muitos são resistentes, de difícil separação/degradação e não há monitoramento estabelecido para grande parte desses contaminantes, a níveis de traços (MANAHAN, 2005; MIERZWA e AQUINO, 2009; HAMID e ESKICIOGLU, 2012; PESSOA, SOUZA, *et al.*, 2014).

Dessa forma, o emprego de tecnologias avançadas, que atinjam altas remoções de diversos DE, torna-se cada vez mais necessária para se evitar bioacumulações e, consequentemente, aumento dos efeitos deletérios em humanos e animais. Nesse sentido, podem ser citados os seguintes tratamentos, para se obter elevados níveis de qualidade da água: Processos de Separação por Membranas (PSM) e Processos Oxidativos Avançados (POA).

Com o emprego de membranas densas, do tipo osmose inversa (OI), os PSM são bastante recomendados para a rejeição de diversos DE, cujas massas molares são acima de

200 Da (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003; SUI, HUANG, *et al.*, 2010). Nesse sentido, são reportadas rejeições de até 99% (LINARES, YANGALI-QUINTANILLA, *et al.*, 2011; GARCIA, MORENO, *et al.*, 2013). Contudo, traços desses micropoluentes ainda são encontrados no permeado do sistema, o que necessita de melhores averiguações da real eficiência do processo (NGHIEM, MANIS, *et al.*, 2004; HEO, BOATENG, *et al.*, 2013).

A utilização concomitante de UV e H_2O_2 permite a geração de radicais $\cdot OH$, os quais agem, de forma não-seletiva, na degradação de compostos orgânicos com elevadas constantes de taxa de oxidação (ordem de grandeza em torno de 10^8 - 10^{11} mol L^{-1} s^{-1}) (The UV/Oxidation Handbook, 1994). Nesse sentido, diversos trabalhos conseguem atingir remoções de até 99% de estrogênios em efluentes de ETE (JAMES, GERMAIN e JUDD, 2014; YAN, NIE, *et al.*, 2015).

Assim, este trabalho apresenta como objetivo geral a remoção de estrogênios, presentes em esgoto sanitário biotratado, utilizando membranas de OI e UV/H_2O_2, bem como o efeito de atividade estrogênica antes e após os tratamentos aplicados.

Como objetivos específicos pode-se destacar:

- Avaliar a presença de 17β-estradiol (E2), 17α-etinilestradiol (EE2), estriol (E3) e atividade estrogênica em matriz de esgoto doméstico biotratado;
- Analisar a influência do pH na remoção de E2, EE2 e E3 em solução sintética de estrogênios, por membranas de OI, em escala de bancada do tipo *dead-end*;;
- Avaliar a influência da recuperação na remoção de E2, EE2, E3 e atividade estrogênica, em esgoto doméstico biotratado, por membranas de OI, em escala de bancada do tipo *dead-end*;
- Estudar a remoção de E2, EE2, E3 e atividade estrogênica, em esgoto doméstico biotratado, empregando tratamento por UV/H_2O_2 em escala de bancada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

2.1.1 Definição

Desreguladores Endócrinos (DE) são substâncias encontradas em matrizes aquosas com concentrações de ng L^{-1} e µg L^{-1} e, portanto, consideradas como micropoluentes emergentes. São caracterizados, principalmente, pelos efeitos adversos que podem causar no sistema endócrino de animais. Apesar do vasto número de trabalhos publicados nos últimos anos, o assunto ainda é pouco conclusivo quando se trata dos efeitos que esses compostos podem causar diretamente aos humanos.

De acordo com o Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), DE são: "Grupo particular dentro dos micropoluentes emergentes que englobam substância exógena ou mistura que altera funções do sistema endócrino e, consequentemente, causa efeitos adversos à saúde de indivíduos, de seus descendentes e/ou populações" (CNRH, 2012). Como consequências tem-se: mimetização e antagonização dos efeitos gerados por hormônios endógenos; desregulação da síntese e do metabolismo de hormônios endógenos; e desregulação da síntese de receptores de hormônios (CNRH, 2012).

Segundo a agência de proteção ambiental americana (USEPA - *United State Environmental Protection Agency*), DE podem ser definidos como agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação e ação ou eliminação do hormônio natural no corpo, que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento, e/ou comportamento dos organismos (USEPA, 2015).

A constante detecção de DE em matrizes aquosas e a potencial capacidade dessas substâncias em influenciar no funcionamento do sistema endócrino estão incentivando governos de diversos países a propor programas estratégicos para desenvolvimentos de metodologias e protocolos, bem como leis regulamentadoras, que incluam os DE como risco iminente à saúde de animais e humanos.

Alguns desses programas são: "*two-tier Endocrine Disruptor Screening (EDSP)*" proposto pelos Estados Unidos (USEPA), "*Strategic Programs on Endocrine Disruptors (SPEED)*" indicado pela agência ambiental do Japão (*Japan Environment Agency*), e "*Joint*

Working Group on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA)" anunciado pela União Européia (OECD) (HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

2.1.2 Substâncias consideradas desreguladores endócrinos

Diversos hormônios naturais, provenientes de animais, humanos e plantas, bem como hormônios sintéticos, podem ser considerados como DE. Além destas classes, há uma vasta lista de outros DE que inclui ftalatos, pesticidas, alquilfenóis, organoclorados, bisfenóis, parabenos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos orgânicos de estanho, policlorados de bisfenilas e retardantes de chama (BILA, 2005; HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

Entretanto, legislações a respeito do monitoramento e valores limites desses micropoluentes, em águas, ainda estão sendo discutidas. A União Européia, por exemplo, lançou uma lista de 45 substâncias prioritárias (dentre elas pesticidas e ftalatos), no domínio da água, com concentrações máximas admissíveis na ordem de $\mu g\ L^{-1}$ (UE, 2013). Nesta mesma publicação, inseriram os hormônios 17β-Estradiol (E2) e 17α-Etinilestradiol (EE2) para serem monitorados, a fim de se investigar os riscos que essas substâncias podem causar (esta é a primeira vez em que hormônios estrogênios entram em uma regulamentação para limitar sua concentração no ambiente).

A USEPA também possui uma lista (Tier 1) na qual são relacionados 52 substâncias (pesticidas) identificadas como DE (USEPA, 2015). Planejam, ainda, a condução de novos testes (Tier 2) para obterem total entendimento do impacto, de compostos considerados DE, no sistema endócrino. Assim, pode-se notar que a temática sobre conhecimento dos compostos considerados DE e seus efeitos ainda está sendo construída no que tange às legislações.

2.1.2.1 Hormônios

Dentre as classes de DE, os hormônios endógenos (produzidos pelo próprio organismo dos animais) têm sido considerados de maior potencial estrogênico quando comparados aos exógenos (compostos industriais como os pesticidas), em uma escala de 10^2 a 10^7 em ordem de grandeza de diferença (HAMID e ESKICIOGLU, 2012). Ademais, o E2 é o estrogênio

mais ativo, conferindo o status de DE com maior potencial estrogênico (BILA, 2005; PEREIRA, 2011; LIU, KANJO e MIZUTANI, 2009; HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

O sistema endócrino está presente em organismos multicelulares como plantas e animais, nos quais se torna responsável pelo crescimento, reprodução, homeostase e metabolismo (BIRKETT e LESTER, 2003). Além disso, ele age em diferentes áreas do corpo, produzindo hormônios com diversas funções, como, por exemplo, as glândulas endócrinas que consistem no Hipotálamo, Pituitária, Tireóide, Paratireóide, glândulas adrenais, pineais e gônadas (BIRKETT e LESTER, 2003).

Os hormônios são “mensageiros” químicos que reagem de forma específica com receptores compatíveis, localizados em células específicas, e como conseqüência geram respostas proporcionais aos níveis lançados no organismo (USEPA, 2015). Esse sistema é conhecido como “chave-fechadura”, no qual um hormônio específico se liga a um receptor (produzido pela célula) para alterar o comportamento celular e os processos biológicos nos tecidos e órgãos (USEPA, 2015).

No caso dos hormônios sexuais, controladores da maturação e reprodução dos organismos, existem três grupamentos principais de classificação (BILA, 2005):

- Hormônios sexuais femininos, como estrogênios e progesteronas;
- Hormônios sexuais masculinos, como androgênios, e
- Corticosteróides, divididos em glicocorticóides e mineralocorticóides.

Especificamente, os hormônios sexuais femininos estrogênicos são responsáveis pela feminilidade dos organismos. Nas mulheres, eles são produzidos nos ovários e excretados para a corrente sanguínea, desenvolvendo características femininas na puberdade e estimulando glândulas mamárias na gravidez; nos animais, por sua vez, os estrogênios atuam na regulação do cio de fêmeas (BILA, 2005).

Sendo assim, existem 4 tipos de estrogênios que podem atuar como DE (PEREIRA, 2011):

- Estrogênios naturais produzidos pelo organismo dos próprios animais;
- Estrogênios sintéticos produzidos para ingestão, como medicamentos;
- Xenoestrogênios gerados pelas indústrias químicas para uso doméstico, e
- Fitoestrogênios presentes em plantas.

Algumas substâncias estrogênicas consideradas DE são listadas na Tabela 1, bem como as categorias nas quais se enquadram.

Tabela 1. Categorias de diversas substâncias estrogênicas consideradas DE (Adaptado de LIU, KANJO e MIZUTANI, 2009)

Categoria	Desreguladores Endócrinos
Estrogênios naturais	Estrona, 17β-Estradiol, 17α-Estradiol, Estriol, 2-Hidroxiestrona ,16α-Hidroxiestrona, Equilin, d-Equilin
Androgênios naturais	Testosterona, Androstenediona, Androsterona, Progesterona,
Fármaco	17α-Etinilestradiol, Noretindrona, Tamoxifen, 17β-Trembolona
Fitoestrogênio	Genisteína, Coumestrol, Daidzeina, Equol, Biocanin A, Formononetin
Xenoestrogênios	Bisfenol A, Nonilfenol, Octilfenol

Os DE podem, então, agir de forma a imitar ou bloquear os hormônios produzidos no corpo e gerar respostas inadequadas ao pleno funcionamento do organismo. Ou seja, têm a capacidade de interagir com os receptores de hormônios, causando efeitos adversos, mesmo em baixas concentrações (BIRKETT e LESTER, 2003). A Figura 1 demonstra as possíveis disfunções endócrinas que podem ocorrer quando: (a) não há presença de DE no meio; (b) o DE imita ou potencializa a resposta; ou (c) há efeito antagonista e a resposta é inibida.

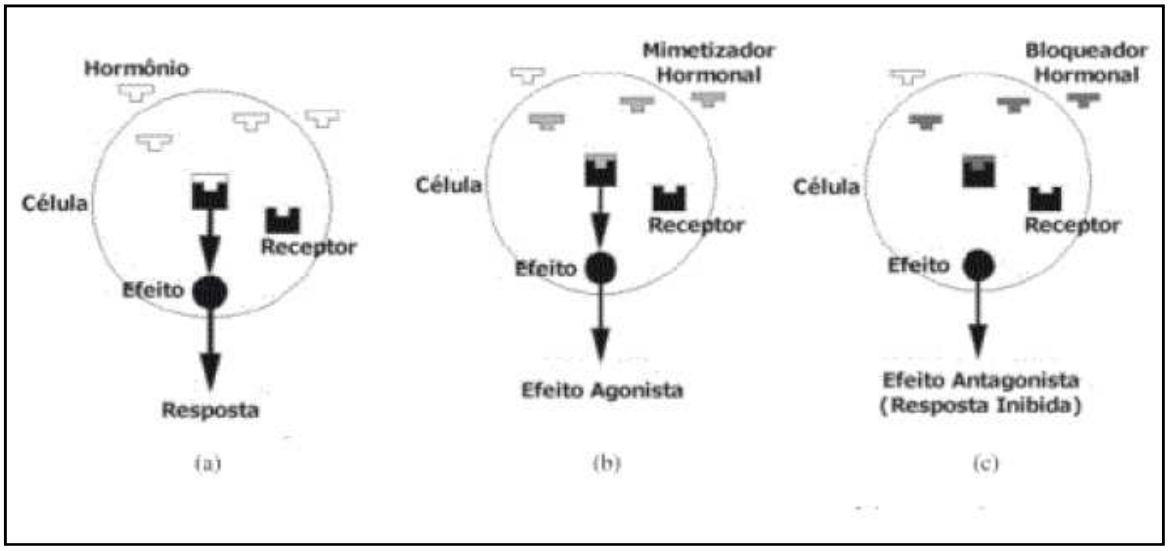


Figura 1. Processo de desregulação endócrina (a) resposta natural (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista (Adaptado de BIRKETT e LESTER, 2003)

O potencial estrogênico dos DE pode estar relacionado às suas propriedades físico-químicas e/ou à estrutura molecular, como no caso da presença do grupamento fenólico nos estrogênios (BILA, 2005; HAMID e ESKICIOGLU, 2012). Além desse grupamento, os estrogênios possuem em comum dois anéis ciclohexano, e um anel ciclopentano, somando um total de 4 anéis cíclicos (HAMID e ESKICIOGLU, 2012). A Figura 2 apresenta a estrutura química dos três estrogênios que serão estudados neste trabalho: E2 (possui um grupamento hidroxila no carbono C17), EE2 (possui um grupamento hidroxila e etinila, ambos no carbono C17) e o Estriol (E3 - possui duas hidroxilas no carbono C16 e C17).

As propriedades físico-químicas dos três estrogênios são apresentadas na Tabela 2 podendo-se prever baixa massa molar (272,4 à 288,4 g mol^{-1}), forma não ionizada a pH neutro e hidrofobicidade, ou coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow}), moderada para E2 e EE2. O log K_{ow} moderado demonstra a tendência de partição do E2 e EE2 com a fase sólida ou apolar (HAMID e ESKICIOGLU, 2012). Em contrapartida, o E3 é o mais hidrofílico dos três estrogênios (log $K_{ow} < 2,5$) tendendo interagir mais com a fase líquida ou polar, o que está de acordo com a solubilidade em água. Além disso, a constante de dissociação ácida (pKa) sugere a forma não ionizada para os estrogênios em matrizes com pH na faixa da neutralidade.

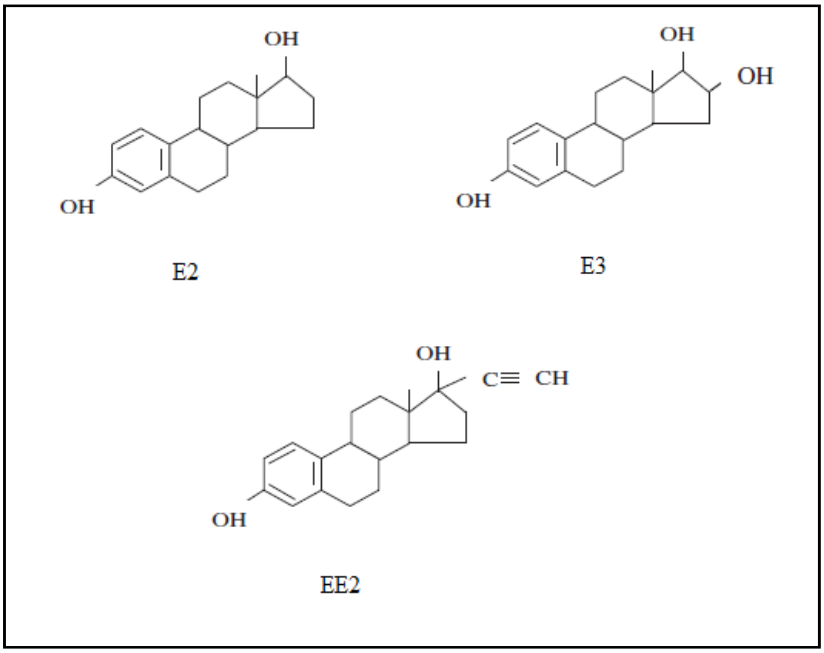


Figura 2. Estrutura química do E2, E3 e EE2

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos estrogênios E2, EE2 e E3 (LIU, KANJO e MIZUTANI, 2009)

	E2	EE2	E3
CAS	50-28-2	57-63-6	50-27-1
Massa molar (g mol^{-1})	272,4	296,4	288,4
Solubilidade em água (mg L^{-1})	3,6	11	441
log K_{ow}	4,01	3,67	2,45
pK_a	10,71	10,4	10,4

O hormônio E2, DE que possui a maior potência relativa para atividade estrogênica (igual a 1), é sintetizado no organismo de todos os vertebrados, apresentando altas proporções em fêmeas (Tabela 3) (WENZEL, MÜLLER e TERNES, 2003; BILA, 2005). De acordo com Silva (2015), a potência relativa é calculada a partir da Equação (1), na qual EC_{50} é a concentração que elucida atividade estrogênica igual a 50% do controle positivo de E2 (BILA, 2005).

$$\text{Potência relativa} = \frac{EC_{50\,(E2)}}{EC_{50(amostra)}} \quad (1)$$

Tabela 3. Concentração de E2 no sangue em diferentes populações (Adaptado de Wenzel, Müllere Ternes, 2003)

População	Concentração no sangue (ng L^{-1})
Meninos pré-puberdade	0,08-1,44
Meninas pré-puberdade	0,6-3,53
Meninas com menarca prematura	2,29
Meninas puberdade	26,77
Fêmeas	92,2
Machos	30
Fêmea menopausa	5,4

Os principais metabólitos de E2, produzidos nos organismos dos animais, são E1 e E3, estando, o primeiro, em equilíbrio metabólico com o E2 (BILA, 2005). A Figura 3 propõe a síntese de E2, E1 e E3, a partir do colesterol.

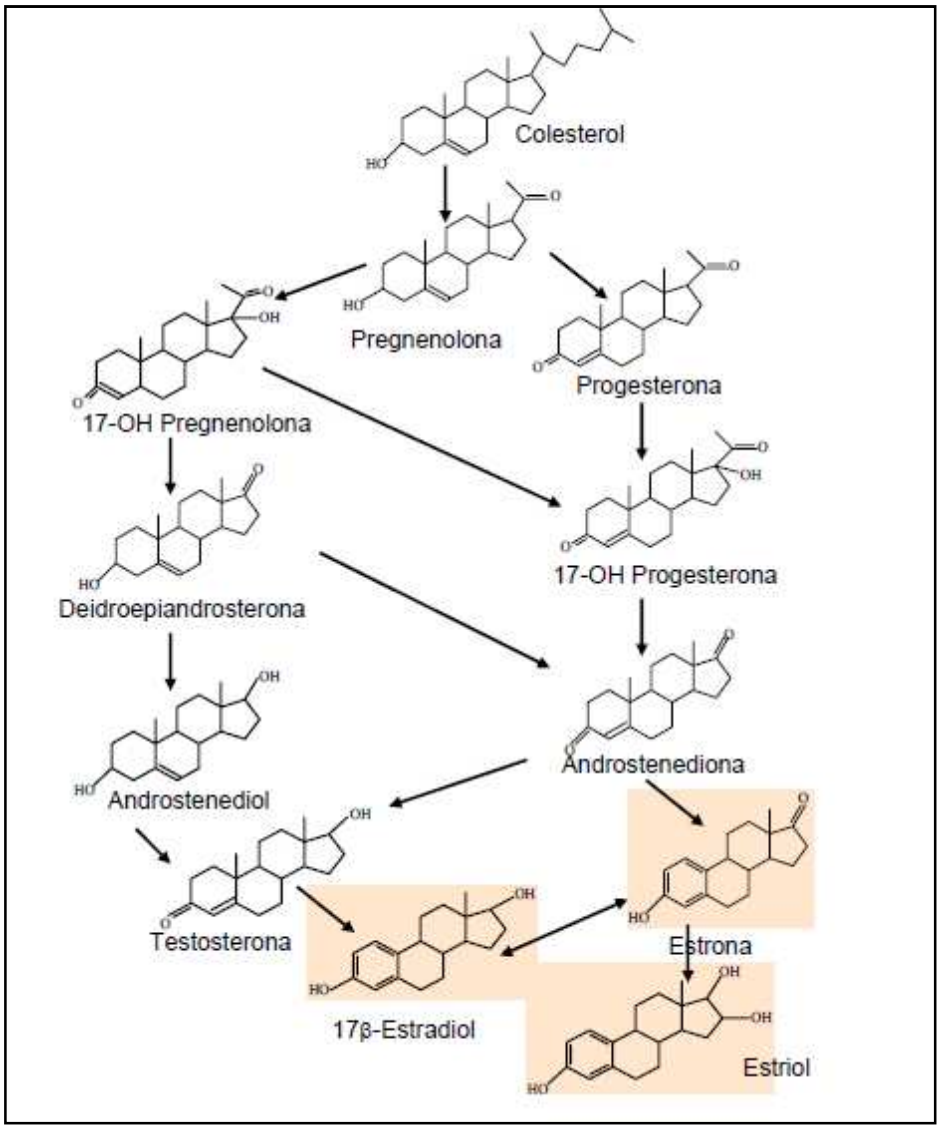


Figura 3. Biossíntese dos estrogênios Estrona, E2 e E3 (BILA, 2005)

A partir da biossíntese apresentada na Figura 3, pode-se prever que a presença de E3 no ambiente é mais disseminada em comparação aos outros dois. Isso acontece pela rápida degradação de E2 em Estrona e, este último, sendo convertido em E3 (VYMAZAL, BřEZINOVÁ e KOžELUH, 2015; YAN, NIE, *et al.*, 2015).

O hormônio E2 é largamente utilizado na medicina para tratamento de distúrbios ginecológicos, por exemplo, na menopausa e no tratamento de doenças crônicas, como o

câncer de próstata e de mama, perda de memória, osteoporose etc. (LUINE, 2015; WENZEL, MÜLLER e TERNES, 2003; STEVENSON, PANAY e PEXMAN-FIETH, 2013; JOHNSON e HARVEY, 2002). Ele também é responsável pelo ciclo menstrual de mulheres, diminuindo drasticamente seus níveis na menopausa (HERRERA e MATHER, 2015).

Como produto de degradação do E2, o E3 apresenta o menor potencial estrogênico dos três hormônios analisados neste trabalho, sendo, portanto, o estrogênio com menor atividade biológica (YOUNG, WHITEHOUSE, *et al.*, 2004). No corpo, o E3 é produzido pela placenta na gestação, aumentando conforme o crescimento embrionário, não sendo encontrado em mulheres não-gestantes (VOSKUHL e PALASZYNSKY, 2001). Poucos são os trabalhos publicados que abordam o E3 como DE, dificultando, portanto, uma análise mais detalhada a respeito deste hormônio.

O estrogênio EE2 é um hormônio sintético amplamente utilizado em contraceptivos femininos em doses terapêuticas de 30 µg dia^{-1} (WENZEL, MÜLLER e TERNES, 2003). Igualmente ao E2, o EE2 é empregado na medicina para combater distúrbios ginecológicos como câncer de mama após a menopausa (JOHNSON e HARVEY, 2002).

2.1.3 Efeitos causados pela exposição aos DE

A literatura apresenta diversos efeitos causados em animais pela presença de DE no ambiente. Em mamíferos e aves, os efeitos são relacionados aos hormônios sexuais (estrogênios e androgênios), os quais regulam o desenvolvimento de fetos (ou ovos) e a diferenciação sexual (WARING e HARRIS, 2005).

Contaminantes como o EE2, BPA, Nonilfenol, PCB e DDT foram analisados quando em contato com mamíferos, apresentando efeitos como câncer de próstata, diminuição de espermas, síndrome do ovário policístico, mortalidade em golfinhos e anormalidades no sistema reprodutivo de roedores (TESKE e ARNOLD, 2008; MARKEY, RUBIN e SOTO, 2003; AGUILAR e BORRELL, 1994).

A presença de DDT em ovos de aves pode afetar a diferenciação sexual (feminização de machos) e a capacidade de copulação com a diminuição da produção de ovos (FRY e TOONE, 1981). O contato com organoclorados também pode afetar a calcificação de ovos e tornar os pintinhos frágeis o suficiente a ponto de não conseguirem eclodir os ovos (HALLDIN, HOLM, *et al.*, 2003).

Os peixes também têm sido objeto de muitos estudos por apresentarem respostas mais efetivas e aparentes (WARING e HARRIS, 2005). Isso ocorre pela baixa capacidade de desentoxicação dos peixes, ocasionando rápida absorção de compostos exógenos (WARING e HARRIS, 2005). O fenômeno de bioacumulação também é mais intenso em peixes, sendo a maioria dos DE, lipofílicos, absorvidos na gordura do animal (WARING e HARRIS, 2005).

Os efeitos ocasionados pelos DE em peixes quando expostos a algumas substâncias, como alquilfenóis, ftalatos, pesticidas, E2, EE2, BPA, dietilbestrol, nonilfenol 6-propil-2-tioracil e benzotriazol, são: feminização, dificuldades na reprodução, problemas na síntese de melanina em embriões, redução de testículos e diminuição da qualidade de espermas (PUY-AZURMENDI, ORTIZ-ZARRAGOITIA, *et al.*, 2013; TIAN, LI, *et al.*, 2012; LIU, YAN, *et al.*, 2012; LIU, QIN, *et al.*, 2012; TANGTIAN, BO, *et al.*, 2012; JIN, YANG, *et al.*, 2012; HATEF, ALAVI, *et al.*, 2012).

Outros animais também têm sido investigados perante a exposição aos DE, como répteis, anfíbios e invertebrados. Apesar de a maioria dos testes já realizados tenham sido de efeito agudo, há um crescente interesse em se analisar os efeitos crônicos em crustáceos, insetos, moluscos e anelídeos (WARING e HARRIS, 2005).

2.1.4 Metodologias para análise de atividade estrogênica

Ainda não há um consenso sobre qual metodologia deverá ser seguida na avaliação da estrogenicidade de contaminantes em amostras reais e seus respectivos efeitos sinérgicos. Sendo assim, existem diversos tipos de testes encontrados na literatura internacional.

Os testes biológicos (*bioassays*) surgem frequentemente como métodos eficazes de detecção de DE. Os procedimentos relacionados a eles podem utilizar respostas de organismos vivos, sistemas biológicos ou de seus componentes, como ferramenta analítica para detectar a presença de contaminantes, os prováveis efeitos inerentes às substâncias (SNYDER, VANDERFORD, *et al.*, 2008). Nesse sentido, podem ser empregadas moléculas, células, tecidos, órgãos, organismos, populações e comunidades (SNYDER, VANDERFORD, *et al.*, 2008).

Segundo Birkett e Lester (2003), os testes biológicos podem ser classificados como ensaios *in vivo* ou *in vitro*. O primeiro é caracterizado por fornecer respostas em organismos vivos, enquanto o segundo é utilizado por apresentar respostas rápidas, contudo, aparentes, e

de menores custos, sendo menos previsíveis os efeitos em organismos vivos (BIRKETT e LESTER, 2003; SNYDER, VANDERFORD, *et al.*, 2008).

Para os testes *in vivo*, Baker (2001) destaca o ensaio uterotrófico, o qual mede a mudança da massa uterina em roedores, e o ensaio de cornificação da mucosa vaginal que detecta a mudança histológica do epitélio vaginal. Há, também, os testes com biomarcadores, como o ensaio de indução da Vitelogenina (VTG) que é uma proteína do sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas (BILA, 2005).

Em contrapartida, os testes *in vitro* têm como vantagens o conhecimento definido das vias de absorção e modo de ação dos contaminantes. Contudo, como suas respostas são limitadas, testes *in vivo* devem ser realizados a fim de se classificar tal substância como DE (BIRKETT e LESTER, 2003).

Neste contexto, os ensaios *in vitro* incluem: ensaios de interação com receptores hormonais (*Competitive Ligand Binding*), técnicas de proliferação celulares (*Cell Proliferation Techniques*) e ensaios de gene repórter em células de mamíferos ou leveduras (*Recombinant Receptor-Reporter Assays*) (BAKER, 2001; BIRKETT e LESTER, 2003; BILA, 2005).

A Tabela 4 fornece os tipos de testes *in vitro* bem como a especificidade de cada um.

Tabela 4. Objetivos dos principais testes *in vitro*.

Classificação	Ensaio	Objetivo
Interação com receptores hormonais	Ligação competitiva nos Receptores de Estrogênio	Afinidade das substâncias de se ligarem ao receptor hormonal
Proliferação celular	Ensaio E-Screen	Habilidade da substância de estimular o crescimento de células que geram respostas ao contato com hormônios
Gene Repórter	Ensaio YES	Habilidade da substância de ativar a transcrição de gene repórter inserido nas células

Diferentes resultados podem ser obtidos a partir de ensaios distintos, mesmo que estes sejam *in vitro*. Liu, Kanjo e Mizutani (2009) selecionaram os dois testes *in vitro* mais comuns

para determinação de potencial estrogênico. Os autores perceberam que, para os mesmos compostos, podem ser obtidas respostas distintas, ou seja, enquanto para um ensaio dado composto apresenta elevado potencial, para outro teste, fornece potencial menor. Os potenciais estrogênicos, referentes aos padrões de quatro hormônios, para o ensaio de *Yeast Estrogen Screen* (YES) e para o ensaio com células humanas (E-screen), estão relacionados na Tabela 5.

Tabela 5. Potencial Estrogênico de diferentes hormônios obtidos pelos ensaios de YES e E-screen (Adaptado de LIU, KANJO e MIZUTANI, 2009)

Hormônio	Potencial Estrogênico	
	YES	E-Screen
E1	0,38	0,01
E2	1	1
E3	0,024	0,3
EE2	1,19	1,25

Estrona (E1); 17β-estradiol (E2); Estriol (E3); 17α-estinilestradiol (EE2); Yeast Estrogen Screen (YES)

2.1.4.1 Yeast Estrogen Screen (YES)

O teste de YES, surgiu com a modificação genética de Cepas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) para identificar compostos que poderiam interagir com os receptores de estrogênio humano (REh) (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). Segundo os autores, uma sequencia de DNA dos REh foram incorporados nos cromossomos da levedura, que possuem plasmídios, os quais carregam o gene repórter *lac*-Z. Quando esse gene repórter entra em contato com alguma substância estrogênica, ele libera uma enzima chamada β-galactosidase, a qual é usada para medir a atividade.

No ensaio YES, é inserido, no meio de análise, um agente cromogênico, que é metabolizado pela β-galactosidase, havendo mudança de cor de amarelo para rosa (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). O substrato empregado pode ser o CPRG (vermelho de clorofenol β-d-galactopiranosida) e sua mudança de cor é normalmente visualizada a 575 nm (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

A Figura 4 ilustra a rota metabólica do estrogênio até a mudança de cor do meio. Ao entrar em contato com a célula de levedura, o hormônio é recebido pelo REh formando um

sistema de “chave-fechadura”, específico para expressar o gene repórter *lac*-Z. A enzima β-galactosidase é, então, sintetizada e excretada para o meio extracelular e quando em contato com o CPRG, o meio passa a apresentar coloração rosa.

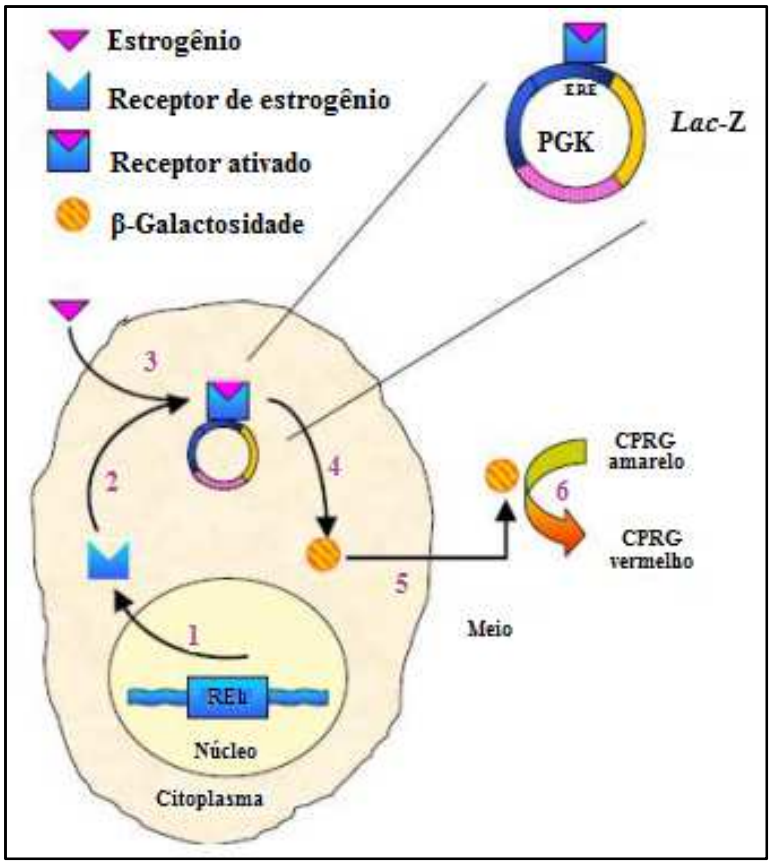


Figura 4. Ilustração da expressão da indução estrogênica por células de levedura (1) e (2) expressão do REh no plasmídeo, (3) ativação do receptor (4) expressão de *lac*-Z, (5) produção da β-Galactosidase, (6) mudança de coloração de amarelo para rosa (Adaptado de ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

O ensaio *in vitro*, YES, é reconhecido pela sua praticidade, sensibilidade e por detectar concentrações de E2 em ng L^{-1} (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). Outro ponto positivo do ensaio é a possibilidade de fornecer respostas sobre a atividade estrogênica em amostras que contenham diferentes DE e outros componentes, como no caso de uma amostra ambiental.

Contudo, por se tratar de um ensaio biológico, algumas amostras ambientais podem conter interferentes que afetam a resposta do ensaio. Pickering et al. (2002) identificaram duas fontes de interferência: toxicidade, que pode afetar o crescimento da levedura e acetatos de

alquilfenóis, que podem suprimir a atividade estrogênica de esteróides e outros alquilfenóis, fornecendo atividade menor que o real potencial.

Frische et al. (2009) sustentam que compostos não-estrogênicos, quando em matriz ambiental ou em mistura de DE, podem gerar efeitos antagonistas ou mascarar ensaios *in vitro*. Os autores ainda destacam que os efeitos tóxicos, que podem mascarar os resultados, e os efeitos antagonistas, se diferenciam pela redução da resposta e pela resposta negativa da toxicidade, respectivamente. Ou seja, o primeiro diminui a resposta da toxicidade apresentada à levedura, enquanto o segundo não induz efeito à levedura. Este último ocorre pela ação do composto não-estrogênico que reduz a captura de DE pelas células.

Nesse sentido, etapas de preparação da amostra são necessárias para a remoção de possíveis interferentes (este assunto será discutido no próximo item). Este ensaio também é bastante suscetível a contaminações durante a preparação, por esse motivo todas as vidrarias devem estar adequadamente limpas e os solventes e padrões necessitam ser de alta pureza (SILVA, 2015). Ademais, as etapas de preparação do ensaio são relativamente rápidas se comparadas aos testes *in vivo* (BILA, 2005; SILVA, 2015).

Sendo assim, o ensaio consiste na construção de curvas dose-resposta, as quais são analisadas e comparadas com a curva padrão do E2 (SILVA, 2015). Essas curvas são obtidas através da diluição seriada da amostra, ou do padrão, em microplacas de 96 poços (Figura 5), sendo a mensuração obtida por espectrofotômetro (SILVA, 2015). Os resultados obtidos são expressos em equivalente à concentração de E2 (Eq-E) (SILVA, 2015).

Como padronização do ensaio, os poços das microplacas (Figura 5) referentes às linhas A, C, E e G recebem as amostras ou padrões, enquanto nas linhas B, D, F e H não são inseridas amostras, sendo, portanto, os brancos negativos do ensaio (BILA, 2005; SILVA, 2015).

Figura 5. Microplaca de 96 poços. Linhas (A) e (B) referem à amostra ambiental; (E) e (F) ao padrão E2 como controle positivo e (C), (D), (F) e (H) como controle negativo sem a amostra. (Fonte: Autor)

2.1.5 Métodos analíticos para quantificação de estrogênios

A quantificação de micropoluentes orgânicos em matrizes ambientais ainda é um grande desafio, pois esses se encontram em concentrações de µg L^{-1} e ng L^{-1}, além de existirem milhares de compostos que podem dificultar ou interferir nas análises. Contudo, com o adequado preparo das amostras, quantificações menores que 1 ng L^{-1} podem ser atingidas (RODRIGUEZ-MOZAZ, RICART, *et al.*, 2015).

Os métodos predominantemente empregados para a quantificação de orgânicos, a níveis de concentrações traço, são baseados na cromatografia (BIRKETT e LESTER, 2003), que tem por definição a separação de componentes estreitamente relacionados em complexas misturas (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001).

Nas separações cromatográficas, a amostra se movimenta através de uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001). Essa fase móvel faz os analitos se deslocarem através de uma fase estacionária (fixa a uma coluna ou a uma superfície sólida), de tal forma que os componentes da amostra se distribuem de modo distinto entre as duas fases (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001).

Aqueles componentes que possuem elevada afinidade com a fase estacionária se movem lentamente, enquanto outros, menos afins, passam mais rápido pela coluna (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001). Como consequência, os componentes se separam em bandas ou áreas discretas que podem ser analisadas qualitativa ou quantitativamente (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001).

A Tabela 6 apresenta, de forma resumida, os tipos de cromatografia em coluna e suas especificidades. Há, também, outros tipos de cromatografia, como a plana ou papel, contudo, são demasiadamente imprecisas, não sendo, portanto, aplicadas à questão dos micropoluentes.

Tabela 6. Classificação dos métodos cromatográficos em coluna (Adaptado de SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001)

Classificação geral	Método específico	Fase estacionária	Tipo de equilíbrio
Cromatografia em fase líquida (CL)	Líquido-líquido ou partição	Líquido adsorvido por um sólido	Distribuição entre líquidos imiscíveis
	Fase líquida	Espécies orgânicas ligadas à superfície sólida	Distribuição entre líquido e a superfície de ligação
	Líquido-sólido ou adsorção	Sólido	Adsorção
	Troca iônica	Resina de troca iônica	Troca iônica
	Exclusão por tamanho	Líquido nos interstícios de um sólido polimérico	Distribuição/exclusão
Cromatografia em fase gasosa (CG)	Gás-líquido	Líquido adsorvido sobre um sólido	Distribuição entre o gás e o líquido
	Fase gás	Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Distribuição entre o líquido e a superfície de ligação
	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
Cromatografia de fluidos supercríticos (CFS)	-	Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Distribuição entre o fluido supercrítico e a superfície de igação

Os métodos cromatográficos, normalmente empregados para quantificação de compostos estrogênicos, são a Cromatografia gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (BIRKETT e LESTER, 2003). Porém, a escolha da melhor técnica dependerá do tipo de amostra e do componente, bem como do grau de especificidade do equipamento para com o composto. Como, por exemplo, a CG é limitada a compostos voláteis e termicamente estáveis, embora seja possível contornar essa situação com o uso de derivatizações (BIRKETT e LESTER, 2003).

Além disso, o tipo do composto pode influenciar na escolha do detector para ambas as cromatografias. Para CLAE, pode-se optar entre detector de fluorescência (FLU), usado somente para compostos fluorescentes, ou o Ultravioleta (UV), este pode ser fixo em somente um comprimento de onda, ou variar - DAD - em demais comprimentos de onda (BIRKETT e LESTER, 2003). Entretanto, a Espectrometria de Massas (EM) vem sendo largamente empregada, acoplada ao CG ou à CLAE, como detector. Particularmente, a EM-EM, que emprega dois espectrômetros em série, frequentemente fornece maior sensibilidade e especificidade (BIRKETT e LESTER, 2003).

Assim, a Tabela 7 apresenta uma seleção de trabalhos e métodos, que foram utilizados para determinação de estrogênios presentes em diferentes matrizes.

Tabela 7. Relação de Trabalhos que empregaram diversos tipos de cromatografia para análise de estrogênios em matrizes distintas, bem como o limite de detecção do método.

Estrogênio	Matriz	Metodologia	LD	Referência
E1	Água de consumo, superficial e sintética	CLAE – EM/EM	6 - 87 ng L^{-1}	(SADMANI, ANDREWS e BAGLEY, 2014)
	Água superficial e subterrânea	CLAE	-	(SANCHES, GALINHA, *et al.*, 2013b)
	Água sintética e efluente de ETE	CLAE CG – EM	50 µg L^{-1} <50 µg L^{-1}	(SAHAR, DAVID, *et al.*, 2011)
	Wetlands	CLAE - EM/EM	-	(VYMAZAL, BřEZINOVÁ e KOžELUH, 2015)
	Efluente primário e secundário de ETE	CG - EM	1,2 - 1,8 ng L^{-1}	(ATKINSON, MARLATT, *et al.*, 2012)

Continuação Tabela 7

Estrogênio	Matriz	Metodologia	LD	Referência
	Efluente de ETE	CLUP - EM/EM	0,2 - 0,8 ng L^{-1}	(KUMAR, NAKADA, *et al.*, 2011)
	Efluente de ETE	CLAE – EM/EM	0,44 - 9,54 ng L^{-1}	(SIM, LEE, *et al.*, 2011)
	Água do mar	CLUP / FLU	23 ng L^{-1}	(LISBOA, FAHNING, *et al.*, 2013)
	Efluente de ETE	CLAE / UV-FLU	2,95 µg L^{-1}	(FRONTISTIS, XEKOUKOULOTAKIS, *et al.*, 2011)
	Efluente de ETE e Hospitalar	CG / EM	40 ng L^{-1}	(SOUZA, 2011)
	Água superficial	CLAE / UV	41 - 330 µg L^{-1}	(STAFIEJ, PYRZYNSKA e REGAN, 2007)
E2	Água de consumo, superficial e sintética	CL / EM-EM	6 - 87 ng L^{-1}	(SADMANI, ANDREWS e BAGLEY, 2014)
	Água superficial e subterrânea	CLAE	-	(SANCHES, GALINHA, *et al.*, 2013b)
	Wetlands	CLAE - EM/EM	-	(VYMAZAL, BřEZINOVÁ e KOžELUH, 2015)
	Efluente primário e secundário de ETE	CG – EM	1,2 - 1,8 ng L^{-1}	(ATKINSON, MARLATT, *et al.*, 2012)
	Efluente de ETE	CLUP - EM/EM	0,2 - 0,8 ng L^{-1}	(KUMAR, NAKADA, *et al.*, 2011)
	Efluente de ETE	CLAE - EM/EM	0,44 - 9,54 ng L^{-1}	(SIM, LEE, *et al.*, 2011)
	Água do mar	CLUP / FLU	3,0 ng L^{-1}	(LISBOA, FAHNING, *et al.*, 2013)
	Efluente de ETE	CLAE / UV-FLU	590 ng L^{-1}	(FRONTISTIS, XEKOUKOULOTAKIS, *et al.*, 2011)

Continuação Tabela 7

Estrogênio	Matriz	Metodologia	LD	Referência
	Efluente de ETE e Hospitalar	CG / EM	40 ng L^{-1}	(SOUZA, 2011)
	Água superficial	CLAE / UV	0,16 – 0,44 mg L^{-1}	(STAFIEJ, PYRZYNSKA e REGAN, 2007)
	Água simulada, superficial e efluente de ETE	CLAE / FLU	2 ng L^{-1}	(LIMA, SILVA, *et al.*, 2012)
EE2	Água superficial e subterrânea	CLAE	-	(SANCHES, GALINHA, *et al.*, 2013b)
	Wetlands	CLAE - EM/EM	-	(VYMAZAL, BřEZINOVÁ e KOžELUH, 2015)
	Efluente primário e secundário de ETE	CG - EM	1,2 - 1,8 ng L^{-1}	(ATKINSON, MARLATT, *et al.*, 2012)
	Efluente de ETE	CLUP - EM/EM	0,2 - 0,8 ng L^{-1}	(KUMAR, NAKADA, *et al.*, 2011)
	Efluente de ETE	CLAE - EM/EM	0,44 - 9,54 ng L^{-1}	(SIM, LEE, *et al.*, 2011)
	Água do mar	CLUP / FLU	2,0 ng L^{-1}	(LISBOA, FAHNING, *et al.*, 2013)
	Efluente de ETE	CLAE / UV-FLU	630 ng L^{-1}	(FRONTISTIS, XEKOUKOULOTAKIS, *et al.*, 2011)
	Efluente de ETE e Hospitalar	CG / EM	20 ng L^{-1}	(SOUZA, 2011)
	Água superficial	CLAE / UV	88 - 510 µg L^{-1}	(STAFIEJ, PYRZYNSKA e REGAN, 2007)
	Água superficial	CLAE / FLU	2 µg L^{-1}	(OLIVEIRA, 2015)
	Água simulada, superficial e efluente de ETE	CLAE / FLU	2 ng L^{-1}	(LIMA, SILVA, *et al.*, 2012)

Continuação Tabela 7

Estrogênio	Matriz	Metodologia	LD	Referência
E3	Água de consumo, superficial e sintética	CLAE / EM-EM	6 - 87 ng L^{-1}	(SADMANI, ANDREWS e BAGLEY, 2014)
	Água superficial e subterrânea	CLAE	-	(SANCHES, GALINHA, *et al.*, 2013b)
	Wetlands	CLAE - EM/EM	-	(VYMAZAL, BřEZINOVÁ e KOžELUH, 2015)
	Efluente de ETE	CLUP - EM/EM	0,2 - 0,8 ng L^{-1}	(KUMAR, NAKADA, *et al.*, 2011)
	Efluente de ETE	CLAE - EM/EM	0,44 - 9,54 ng L^{-1}	(SIM, LEE, *et al.*, 2011)
	Água do mar	CLUP / FLU	2,8 ng L^{-1}	(LISBOA, FAHNING, *et al.*, 2013)
	Água superficial	CLAE / UV	0.24 - 0.66 mg L^{-1}	(STAFIEJ, PYRZYNSKA e REGAN, 2007)

Limite de detecção (LD); Cromatografia Líquida (CL); Cromatografia Gasosa (CG); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); Cromatografia Líquida de Ultra Pressão (CLUP); Espectrometria de Massas (EM); Fluorescência (FLU); Ultravioleta (UV).

2.1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é uma das técnicas analíticas de separação mais amplamente utilizada na indústria farmacêuticas na ciência e na sociedade em geral, por apresentar alta sensibilidade, fácil adaptação às determinações quantitativas e pela sua adequação para separações de espécies não voláteis ou termolábeis (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001).

Alguns exemplos de materiais que são analisados por CLAE são: aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, hidrocarbonetos, carboidratos, fármacos, praguicidas, antibióticos, esteróides, organometálicos e uma variedade de substâncias inorgânicas (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001).

A CLAE se diferencia da CL tradicional por empregar pressão maior de trabalho, devido à baixa permeabilidade de colunas com partículas menores (enquanto na CL tradicional usa-se pressão atmosférica, na CLAE trabalha-se com elevadas pressões),

possibilidade de mistura de fases móveis (até três solventes com polaridades extremamente diferentes) e aplicação de pressões isocráticas ou gradientes (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001; DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998).

Por definição, separações isocráticas utilizam um solvente com composição constante, enquanto a eluição gradiente pode-se empregar até três sistemas de solventes em pressões que mudam conforme o tempo (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001). Entretanto, com o aprimoramento dos equipamentos de CLAE, é possível trabalhar em modo isocrático com até três solventes.

A aplicação do gradiente favorece a separação cromatográfica de componentes que coeluem no mesmo tempo de retenção para o modo isocrático. Nesse sentido, cromatogramas, que apresentam picos sobrepostos, podem ser aperfeiçoados pela mudança da porcentagem entre as fases móveis em tempos diversos (SKOOG, HOLER e NIEMAN, 2001).

A Figura 6 apresenta a diferença entre dois cromatogramas que empregam (A) vazão isocrática e (B) vazão gradiente (discutidos anteriormente).

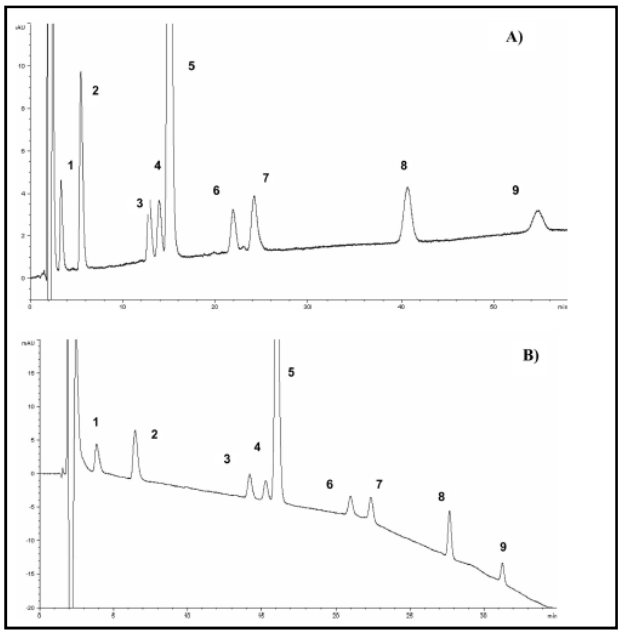


Figura 6. Diferença entre cromatogramas com vazão isocrática (A) e gradiente (B) (STAFIEJ, PYRZYNSKA e REGAN, 2007)

A Figura 7 demonstra um esquema típico da CLAE, a qual se baseia em um reservatório da fase móvel, bomba de alta pressão, válvula de injeção, coluna cromatográfica e computador para codificação de sinal e tratamento dos dados recebidos pelo detector.

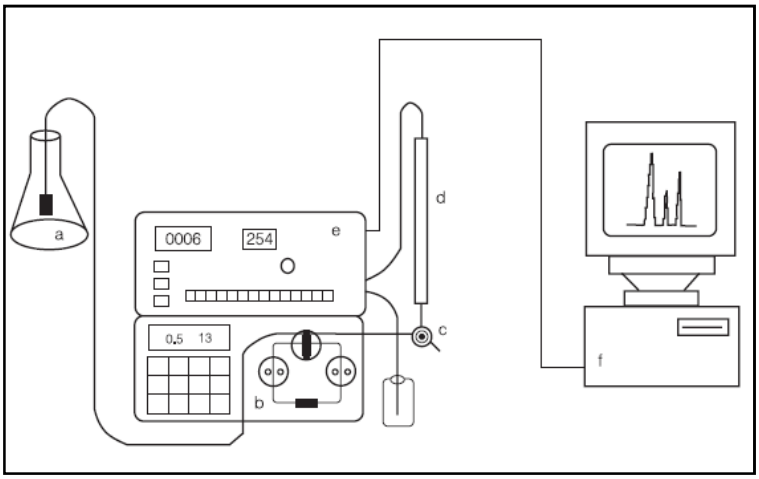


Figura 7. Equipamento básico de CLAE: (a) reservatório das fases móveis; (b) bomba de alta pressão; (c) válvula de injeção; (d) coluna cromatográfica; (e) detector e (f) registrador (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998)

O desenvolvimento e a implementação de metodologias analíticas, para detectar e quantificar micropoluentes em diferentes matrizes, precisam ser realizados para cada tipo de cromatógrafo, o qual possui ampla variedade de colunas que podem ser empregadas, bem como solventes, temperatura e vazão de operação.

Nesse sentido, para quantificação de cada componente ou grupo de componentes, é preciso ser implementada metodologia adequada no cromatógrafo e sua posterior validação. Alguns órgãos como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto de Metrologia) disponibilizam regras a serem seguidas para validação de métodos analíticos para CG e CLAE. Os testes podem variar para cada instituto, mas essencialmente, eles englobam os seguintes itens (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010):

- Seletividade: capacidade do método de medir exatamente o composto em presença de interferentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, os quais podem aumentar ou reduzir o sinal;
- Precisão: avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra;
- Recuperação ou Tendência: analisada quantitativamente pela exatidão, que é a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra;

- Robustez: medida da capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos;
- Linearidade: capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito;
- Limite de Detecção (LD): menor nível detectável do analito, e
- Limite de Quantificação (LQ): menor nível quantificável com precisão, robustez e exatidão aceitáveis.

2.1.6 Extração em Fase Sólida (EFS)

A extração em fase sólida (EFS) é definida por ser uma tecnologia de preparo de amostras que usa partículas sólidas, material de empacotamento cromatográfico, geralmente em cartuchos (do tipo seringa), para separar, quimicamente, diferentes componentes da amostra (WATERS, 2016).

Em geral a EFS pode e tem sido empregada em técnicas como: concentração de analitos, remoção de substâncias interferentes, mudança de matriz do analito, remoção de sais, fracionamento de diferentes compostos e derivatização de analitos (SCHÜßELER, 2016; WATERS, 2016). Na maioria dos casos, esses efeitos ocorrem simultaneamente, pois os analitos podem ser adsorvidos no cartucho de EFS (Figura 8), ou passar direto pelo extrator, com a retenção de interferentes (Figura 9).

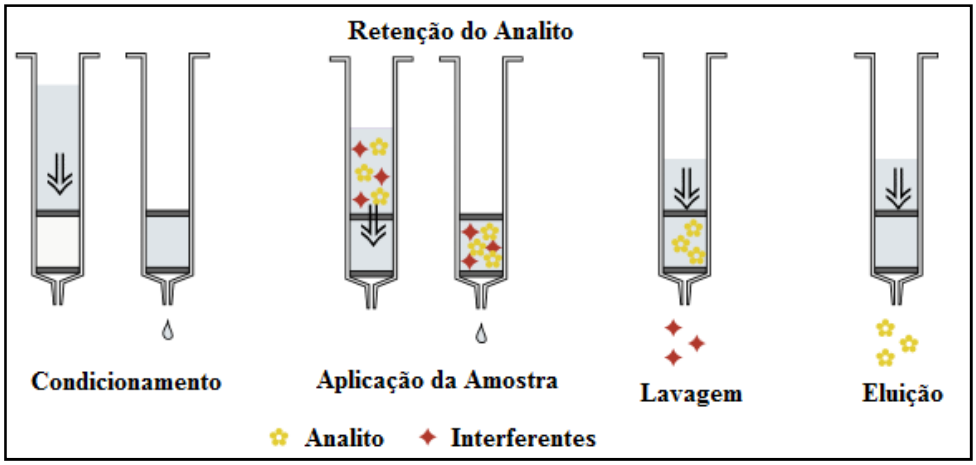


Figura 8. EFS para retenção do analito (Adaptado de SCHÜßELER, 2016).

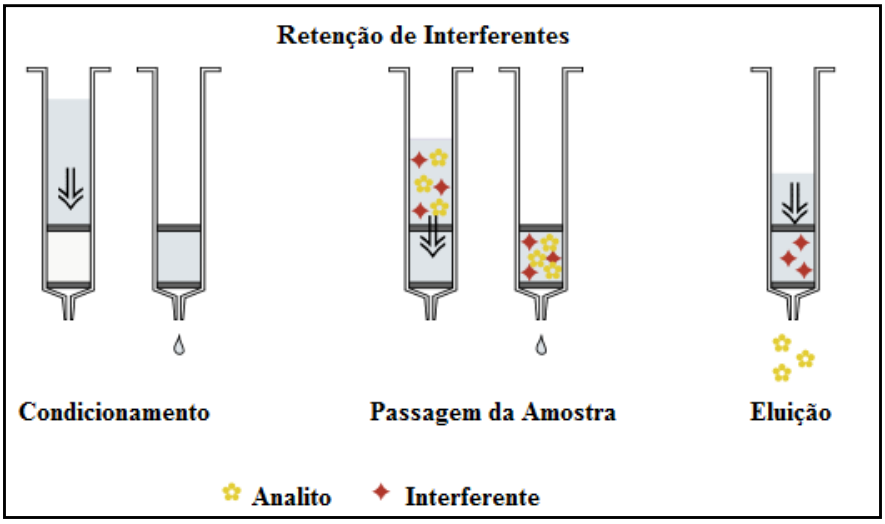


Figura 9. EFS para retenção de interferentes (Adaptado de SCHÜßELER, 2016).

A Figura 8 demonstra a passagem da amostra pela fase sólida e a consequente concentração dos analitos, para posterior eluição, enquanto os interferentes e os solventes não são retidos. De acordo com Schübeler (2016), um cartucho de EFS deve apresentar baixa separação cromatográfica, pois, ao contrário, necessitaria de mais de um eluente para dessorver os analitos de interesse. Em alguns casos, os interferentes podem interagir mais com a fase sólida que os compostos alvo, sendo, a simples filtração pela EFS, a mais indicada para a retenção dos interferentes (Figura 9).

Um típico cartucho de EFS é fabricado em materiais de baixa pressão e resistentes a solventes (plástico ou vidro), com partículas maiores ou iguais a 30 cm de diâmetro. A passagem de amostras, ou de solventes, pode ser promovida por gravidade ou pela implementação de vácuo (WATERS, 2016).

No caso específico dos hormônios E1, E2, EE2 e E3, normalmente são empregados cartuchos de EFS do tipo C_{18}, para posteriormente serem analisados em cromatografia (BIRKETT e LESTER, 2003). As recuperações dos estrogênios vão de 57 a 116% para os diversos tipos de C_{18} comerciais, em matrizes de afluente e efluente de ETE (BIRKETT e LESTER, 2003). Os autores ainda recomendam a pré-filtração como forma de remoção de material particulado, a fim de se extrair somente os compostos dissolvidos na amostra.

2.1.7 Presença de desreguladores endócrinos em esgoto sanitário

Efluentes de ETE estão sendo associados ao aparecimento de micropoluentes, bem como seus efeitos, em rios e baías receptores dessas correntes. A Figura 10 apresenta efluentes advindos de indústrias ou de ETE que contaminam o meio aquático pela ineficiência dos processos de remoção empregados (SOUZA, 2011). Isso ocorre, pois grande parte dos processos implementados nas ETE não foram planejados especificamente para a remoção de DE (HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

Fenômenos como sorção em sedimentos de rios, bioacumulação e biomagnificação, são frequentemente reportados na literatura pela recalcitrância apresentada para a maioria dos DE (MANAHAN, 2005; SOUZA, 2011). Apesar da dificuldade de degradação, diversas reações podem ocorrer no ambiente natural, como: fotólise (degradação de substâncias pela presença de luz solar), biodegradação (a presença de despejos orgânicos favorece a proliferação de microrganismos) e hidrólise (moléculas altamente polares, cuja quebra das ligações são realizadas pela água) (Figura 10). Essas reações podem gerar substâncias ativas ou inativas biologicamente. Por exemplo, os estrogênios naturais, que são expelidos pelo corpo humano na forma inativa e quando incorporados ao ambiente passam para a forma ativa, podendo causar efeitos deletérios à biota ao redor (BIRKETT e LESTER, 2003; MANAHAN, 2005). Outro fenômeno que também deve ser considerado é a volatilização do composto para a atmosfera (Figura 10).

A Figura 10 apresenta as rotas dos despejos, comentadas anteriormente, bem como os fenômenos atrelados ao ambiente natural.

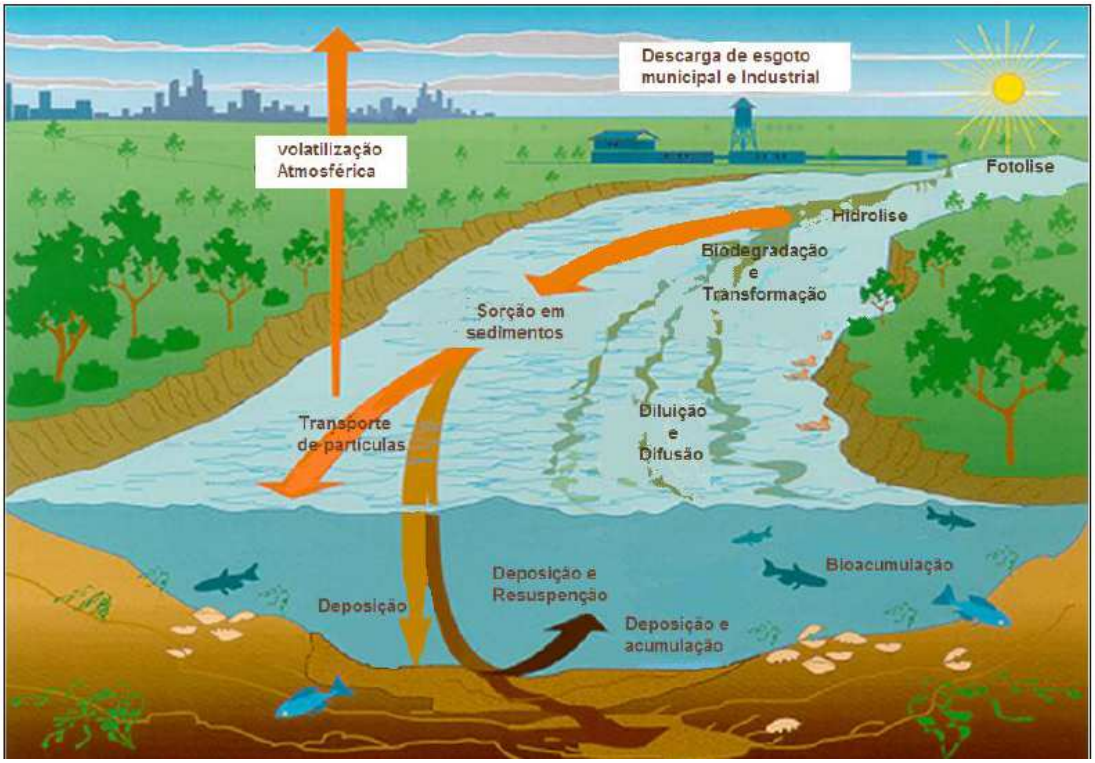


Figura 10. Rotas de acumulação e transformação de micropoluentes no ambiente (SOUZA, 2011).

Vários autores analisaram a presença de estrogênios em afluentes e efluentes de ETE. Sendo assim, a Tabela 8 foi elaborada com base nestes trabalhos.

Tabela 8. Presença de DE em afluente e efluente de ETE em diversos países/regiões.

Autor	País	Processos da ETE	Estrogênios	Concentração afluente (ng L^{-1})	Concentração efluente (ng L^{-1})	Remoção (%)
(1)	República Tcheca	Wetlands	E1	28,1-56,2	alq.-5,9	> 85
			E2	4,1-15,4	alq.	100%
			E3	alq.-16,0		
			EE2	ald.-6,0		
(2)	Canadá	-	E1	0,9-20	-	-
			E2	1,4-30		
			EE2	ald.		
(3)	Canadá	Primário e Secundário	E1	13,1-104	11,2-370	-
			E2	ald.-66,9	ald.-26,7	
			EE2	ald.-5,7	ald.-9,8	
(4)	Inglaterra	Lodos Ativados, Filtro Biológico, Tratamento Terciário e Remoção de nitrogênio	E1	51	-	80
			E2	43		70
			E3	54		100
			EE2	2		75
(5)	China	-	E1	6-8.150	1-529	-
			E2	alq.-634	alq.	
			α-E2	alq.-766	alq.	

Continuação Tabela 8

Autor	País	Processos da ETE	Estrogênios	Concentração afluente (ng L^{-1})	Concentração efluente (ng L^{-1})	Remoção (%)
			E3	46-2.280	15-273	
			EE2	alq.	alq.	
(6)	Brasil	Lodos ativados	E1	40	-	83
			E2	21		99
(7)	Brasil	Lodos Ativados, UASB, Flotação por ar dissolvido, Lagoa Anaeróbia, Facultativa e de Maturação	E1	40-1.380	ald.	100
			E2	70-2.270	30-760	57-67
			EE2	30-1.260	ald.-470	44-99
(8)	Brasil	Lodos Ativados, UASB, Lagoa Facultativa e de Maturação	E1	ald.-3.050	ald.-2.080	31-100
			E2	ald.-776	ald.-397	62-96
			E2-17α	ald.-2.300	ald. 1.250	26-100
			EE2	ald.-3.180	ald.-176	30-100
(9)	África do Sul	Lodos Ativados	E1	13-351	3-78	12
			E2	20-199	4-107	12
			E3	3-9	ald.	100
			EE2	10-95	1-8	78
(10)	Brasil	Lagoa de Estabilização, Lodos Ativados e Tratamento	E1	800-24.500	ald.-4.350	42-100
			E2	320-7.400	ald.-3.420	15-100

Continuação Tabela 8

Autor	País	Processos da ETE	Estrogênios	Concentração afluente (ng L^{-1})	Concentração efluente (ng L^{-1})	Remoção (%)
		primário	E2-17α	400-13.690	ald.-13.690	29-100
			EE2	2.680-5.230	ald.-1.200	42-100

Abaixo do limite de quantificação (alq.); Abaixo do limite de detecção (ald.); Estrona (E1); 17β-Estradiol (E2); Estriol (E3) 17α-Etinilestradiol (EE2); 17β-Estradiol-17-acetato (E2-17α)

(1) Vymazal, Brezinová e Kozeluh (2015); (2) Saravanabhavan, Helleur e Hellou (2009); (3) Atkinson et al. (2012); (4) Kumar et al. (2011); (5) Sim et al. (2011); (6) Ternes et al. (1999); (7) Froehner et al. (2011); (8) Pessoa et al. (2014); (9) Manickum e John (2014); (10) Souza (2011)

A presença desses micropoluentes em efluentes de ETE depende de diversos fatores como a taxa de produção e de consumo de produtos, o metabolismo dos componentes (taxa de excreção), consumo de água por dia e por pessoa, concentração dos componentes na entrada da ETE, tamanho e processos empregados pela ETE, recalcitrância das substâncias, clima, etc. (HAMID e ESKICIOGLU, 2012; LUO, GUO, *et al.*, 2014; ROBERTS, KUMAR, *et al.*, 2016).

A excreção (via urinária) é a principal fonte de contaminação de águas superficiais. Contudo, doses de E2 podem ser lançadas ao ambiente por intermédio de efluentes de indústrias farmacêuticas (WENZEL, MÜLLER e TERNES, 2003). Segundo Johnson e Harvey (2002), o E2 é rapidamente biodegradável no período de 14 à 28 dias, no qual a sorção no lodo biológico é o principal meio de remoção. Diferentemente dos demais estrogênios naturais, o EE2 é mais persistente no ambiente, apresentando tempo de meia vida de 17 dias pela biodegradação aeróbia (YOUNG, WHITEHOUSE, *et al.*, 2004).

No Brasil, a detecção de DE ainda é bastante insipiente se comparada com outras regiões do mundo. Isso ocorre, principalmente, pela deficiência em pesquisas voltadas para detecção e pela pouca quantidade de trabalhos publicados na literatura a respeito da análise de águas superficiais brasileiras, que englobem esses tipos de compostos.

Como exemplo, pode-se citar os EUA, que começaram a publicar sobre o assunto desde 1974 com a abordagem das Isoflavonas (consideradas hoje como desreguladores endócrinos) (VARMA, 2014). Este assunto chega ao Brasil somente em 1999 com Ternes et al. (1999) avaliando a presença de hormônios esteróides em águas do Rio de Janeiro, Brasil. Ternes et al. (1999) detectou a presença de Estrona, E2 e EE2 no afluente de ETE em concentrações que variavam de 0,021 a 0,040 µg/L.

Froehmer et. al. (2011) confirmaram a presença de desreguladores endócrinos (BPA, E1, E2e EE2) em efluentes brutos de ETE localizada na cidade de Curitiba, Brasil. De acordo com os autores, essas substâncias também estavam presentes no lodo do processo biológico empregado pelas estações de tratamento.

De acordo com Pessoa et. al. (2014), as amostras obtidas em cinco ETE, localizadas no Estado do Ceará, Brasil, apresentavam alta atividade estrogênica se comparadas com outras localidades. Essa estrogenicidade é caracterizada por haverem altas concentrações (faixa de ng L^{-1}) de hormônios esteróides como: Estrona, E2 e EE2 e 17β-Estradiol-17-Acetato. Contudo, os autores remetem esse resultado ao baixo índice pluviométrico e às temperaturas elevadas, características da região.

Algumas pesquisas afirmam que os processos de tratamento realizados em ETE brasileiras precisam ser modificados, a fim de promover a total remoção de micropoluentes, os quais, mesmo em concentrações traço, podem apresentar efeitos deletérios ao ambiente aquático (peixes e crustáceos) e em seres humanos (SODRÉ, MONTAGNER, *et al.*, 2007; PESSOA, SOUZA, *et al.*, 2014). De acordo com Brandt et al. (2013), alguns desreguladores endócrinos, como BPA, permanecem no efluente tratado de diversas plantas industriais localizadas em Belo Horizonte, Brasil.

Por exemplo, muitos desses contaminantes não são totalmente mineralizados ou metabolizados nos tratamentos convencionais de esgoto. Parte das substâncias recalcitrantes fica retida no lodo do processo biológico, o qual é destinado a Aterros Sanitários (CLARA, STRENN, *et al.*, 2004; FROEHNER, PICCIONI, *et al.*, 2011). Nesse caso, a disposição de resíduos sólidos no Brasil, que em grande parte é inadequada, passa a ser uma fonte de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, causada pela lixiviação que ocorre em aterros não controlados (MIERZWA e AQUINO, 2009).

Alguns sistemas de tratamento de esgotos implantados no Ceará também não conseguem obter elevadas remoções de certos estrogênios como estrona, EE2 e 17β-Estradiol-17-Acetato, apresentando 48, 40 e 12% de eficiência, respectivamente (PESSOA, SOUZA, *et al.*, 2014). Isso ocorre em processos que ainda empregam Lagoas Facultativas e de Maturação, conferindo-lhes a necessidade de implementação de um tratamento terciário.

No Rio de Janeiro, Ternes et al. (1999) analisaram a remoção de três hormônios esteróides em uma ETE. Verificou-se que o E2 foi completamente removido após a passagem pelo processo de lodos ativados. Contudo, para a estrona e EE2 houve remoção de 83 e 78%, respectivamente.

A partir do exposto, afirma-se a necessidade de mais estudos sobre a presença de micropoluentes nos mananciais brasileiros e a permanência desses compostos após os processos de tratamento utilizados, o que irá possibilitar a verificação da real necessidade de adequação de ETE à remoção dos DE.

Cálculos teóricos, sobre a estimativa de lançamento de hormônios no ambiente, são normalmente utilizados para comparação com as concentrações encontradas através de métodos analíticos. Pode-se prever, portanto, a quantidade de excreção diária dos estrogênios (Tabela 9), bem como estimar a quantidade de hormônio lançado durante o ano em esgoto sanitário (Tabela 10).

Tabela 9. Estimativa da excreção diária em µg de E2, E3 e dos estrogênios em geral, para crianças, homens, mulheres, mulheres grávidas e mulheres na menopausa

População	Excreção diária (µg dia^{-1})			
	E1[(2)]	**E2**[(2)]	**E3**[(2)]	**Estrogênios**[(1)]
Crianças	-	-	-	20
Homens	3,9	1,6	1,5	85
Mulheres	8	3,5	4,8	250
Mulheres grávidas	600	259	6.000	10.000
Mulheres menopausa	4	2,3	1	28

17β-Estradiol (E2), Estriol (E3);
(1) Wenzel, Müller e Ternes (2003) (2) Mierzwa e Aquino (2009)

Tabela 10. Estimativa da concentração de estrogênios em esgoto sanitário a partir da carga anual lançada por homens acima de 12 anos, mulheres entre 12 e 49 anos e mulheres acima de 49 anos

Categoria	População	Carga Anual (kg)			Ref.
		E2	**E3**	**EE2**	
Homens acima de 12 anos	61.608.671	35,98	33,73	-	(1)
	75.623.422	44,16	41,40	-	(2)
Mulheres entre 12 e 49 anos	50.437.982	64,43	88,37	225,52	(1)
	58.755.014	75,06	102,94	750,60	(2)
Mulheres acima de 49 anos	14.508.639	12,18	4,3	-	(1)
	21.104.028	17,72	30,81	-	(2)
Total	126.555.292	112,59	126,4	225,52	(1)
	155.482.464	136,94	152,05	750,60	(2)
Concentração nos esgotos (ng L^{-1})		17,1	19,2	34,2	(1)
		14,84	16,48	81,34	(2)

17β-Estradiol (E2), Estriol (E3), 17α-Etinilestradiol (EE2);
(1) Mierzwa e Aquino (2009), (2) Silva (2014)

A estimativa feita na Tabela 10 leva em consideração certos indicadores, como a quantidade de água consumida nacionalmente, a população e a excreção pelas categorias selecionadas (SILVA, 2014). Utilizando um volume de água consumido de 142,7 e 162,6 L dia^{-1} hab.$^{-1}$, Mierzwa e Aquino (2009) e Silva (2014) estimaram a excreção anual de estrogênios para os anos de 2004 e 2011, respectivamente, para o território brasileiro Tabela 10.

Pela Tabela 10, pode-se concluir que, para o Brasil, não houve mudanças significativas entre o ano de 2004 e 2011 para E2 e E3. Contudo, para EE2 houve um aumento de, aproximadamente, 60% na previsão deste estrogênio em esgotos sanitários. Isso ocorre pelo aumento da população feminina entre 12 e 49 anos, bem como o aumento do consumo de pílulas anticoncepcionais.

2.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)

A utilização de membranas para diversos fins teve seu início no século XVIII, quando o filósofo Abé Nolet introduziu o conceito de osmose para descrever o fenômeno de permeação pelo diafragma (BAKER, 2004). A necessidade de aplicar e aprimorar os processos de tratamento de águas, após a segunda guerra mundial, fez com que a tecnologia de filtração por membranas, neste caso a microfiltração (MF), ganhasse espaço dentre os processos existentes na época, e hoje, após quase três séculos de diferença, já é utilizada intensa e extensivamente em tratamentos de água para consumo humano (BAKER, 2004).

Os Processos de Separação por Membranas (PSM), quando utilizados em tratamento de efluentes, podem ser considerados um tratamento terciário ou de polimento, diferentemente dos processos de separação convencionais (PSC). Estes últimos são regidos pela separação de fases, por equilíbrio termodinâmico, enquanto o primeiro é baseado na taxa de transferência de massa, por um meio físico, o qual sofre a ação de diversas forças resultantes, como: gradiente de pressão, concentração, temperatura e campo elétrico (NATH, 2008).

De acordo com Weatherley (1994), a utilização de PSM é mais vantajosa em relação aos PSC, pois necessitam de menos energia e podem ser administrados em condições moderadas, como, por exemplo, temperaturas nas quais o material empregado as suporte. Como exemplos de PSC podem ser citados: destilação, cristalização, evaporação, extração, adsorção, absorção.

O termo membrana, para processos de separação, pode ser definido como uma barreira que separa duas fases distintas e restringe o transporte de diversos químicos por seletividade, na qual pode haver a interação de diversas forças (NATH, 2008). De acordo com Harbert, Borges e Nobrega (2003), a definição de membrana pode ser feita como sendo uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte dos componentes presentes nas fases. Mulder (2000) define que o PSM utiliza uma barreira seletiva entre duas fases. Para Baker (2004), membranas são uma interface fina e discreta que controla a permeação de espécies químicas. O autor ainda chama atenção para a correta nomeação dos

sistemas de membranas, os quais não podem ser chamados de filtros, pois estes últimos são correlacionados à separação de partículas, entre 1 e 10μm.

2.2.1 Tipos de membranas

Existe uma grande variedade de membranas comerciais para diversas aplicações em processos. A escolha do tipo de membrana dependerá de vários fatores como: permeabilidade, estabilidade e compatibilidade química, força mecânica, formação de *fouling*, característica dos poros, entre outros (NATH, 2008).

Nesse sentido, as membranas podem ser classificadas de diversas formas: quanto à estrutura das membranas (morfologia, material, porosidade e geometria), a propriedade de transporte, a força motriz, etc. (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003; NATH, 2008; MULDER, 2000; MALLEVIALLE, ODENDAAL e WIESNER, 1996), que serão mostrados a seguir.

2.2.1.1 Estruturas das membranas

Morfologia:

As membranas podem apresentar morfologias diferentes dependendo da utilização a qual se destinam, podendo ser densas, porosas ou compostas; isotrópicas ou anisotrópicas (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003).

As membranas densas são caracterizadas por apresentarem transferência de massa por dissolução e difusão, na qual a solução a ser filtrada, juntamente com o material filtrante, forma uma mistura homogênea (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Diferentemente, em membranas porosas esse fenômeno acontece por exclusão de tamanho, ou seja, dependendo do tamanho e da estrutura dos poros ocorrerá a difusão e/ou convecção.

As membranas isotrópicas possuem tamanhos de poros uniformes, em contrapartida, as membranas anisotrópicas possuem tamanhos de poros variados ao longo da superfície (NATH, 2008).

Material de origem:

O material que constitui a membrana deve ser analisado como forma de previsão da eficiência do processo, pois, dependendo das características físico/químicas e conformacionais da membrana, a rejeição poderá ser alta ou baixa, para variados componentes.

Nesse sentido, existem diversas matérias-primas que podem ser selecionadas para a fabricação de membranas. De acordo com Harbert, Borges e Nobrega (2003), as membranas sintéticas comerciais podem ser poliméricas ou inorgânicas. As primeiras possuem polímeros em sua estrutura, na qual grande parte são materiais orgânicos, e as últimas podem ser produtos de beneficiamento de metais, cerâmicos, carbonos ou óxidos metálicos.

Polímeros, por definição, são macromoléculas formadas por repetições de estruturas pequenas (monômeros) pela reação de polimerização (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001). Conforme o manejo de operação dessa reação, o material polimérico apresentará diversas formas (compactação, ramificação, conformação, encadeamento, arranjo atômico, etc.).

Assim, de acordo com a mobilidade da cadeia atômica do polímero ocorrerá o movimento difusional de outras moléculas ao longo do processo de separação. Ou seja, a difusão e a absorção dependerão das características moleculares e atômicas desse polímero, como o grau de cristalinidade (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Entende-se como grau de cristalinidade a relação entre a região amorfa e cristalina de uma amostra de polímero expressa em porcentagem (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Segundo Nath (2008), as membranas poliméricas ainda podem ser subdividas em: polímeros maleáveis (operam acima da temperatura de transição vítrea com elevados fluxos de orgânicos e baixos fluxos de água); polímeros vítreos (operam abaixo da temperatura de transição vítrea sendo amorfos e cristalinos); e polímeros de troca iônica (são resinas de troca iônica feitas na forma de membranas).

A Tabela 11 relaciona os principais materiais, dos quais são feitas as membranas, para os tipos de processos normalmente empregados:

Tabela 11. Materiais utilizados na fabricação de membranas para diversos processos de separação (Adaptado de Nath, 2008).

Materiais	Processos
Acetato de celulose Triacetato de celulose Poliamida (aromático)	Osmose Inversa, Microfiltração, Ultrafiltração e Eletrodiálise
Nitrato de celulose Blenda de acetato/triacetato de celulose Policarbonato PVC Polipropileno PTFE	Microfiltração
PVA PAN Copolímero-PAN Polissulfona	Microfiltração e Ultrafiltração
PBI	Osmose Inversa
Poliamida	Osmose Inversa e Ultrafiltração
Fluoreto de Polivinilidina	Ultrafiltração

Policloreto de Vinila (PVC); Politetrafluoretileno (PTFE); Acetato de Polivinila (PVA); Poliacrinolitrila (PAN); Polibenzimidazole (PBI)

As membranas inorgânicas são amplamente conhecidas como membranas cerâmicas, material que confere grande versatilidade em operações que necessitem de altas temperaturas (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003; NATH, 2008). Enquanto as membranas metálicas suportam temperaturas de até 800°C, as cerâmicas podem ser introduzidas em processos com mais de 1000°C (NATH, 2008). Nesse sentido, as membranas cerâmicas competem diretamente com as orgânicas pelo tipo de processo, no qual se pode empregá-las, pois aquelas aguentam condições extremas de temperatura e pH.

2.2.1.2 Força Motriz

Os diversos tipos de processos que utilizam membranas como meio filtrante podem, também, ser caracterizados conforme a força motriz aplicada. Para tratamento de efluentes, normalmente, são aplicadas duas forças motrizes: diferença de pressão ou gradiente de

concentração (BAKER, 2004). O primeiro é comumente empregado para tratamento de efluentes líquidos, portanto, de grande importância para este trabalho.

Dependendo das características físico/químicas apresentadas pela matriz, como a presença de partículas em suspensão e o grau de purificação, podem ser selecionados diversos tipos de membranas que utilizam como força motriz a diferença de pressão: MF, Ultrafiltração (UF), Nanofiltração (NF) e Osmose Inversa (OI) (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003; BAKER, 2004).

As membranas de MF e UF são empregadas para reter materiais em suspensão, células, colóides e macromoléculas, sendo normalmente pré-tratamento para a NF ou a OI (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Em contrapartida, as membranas de NF conseguem reter enzimas e vitaminas, mas não retém sais, os quais são separados da solução quando se emprega OI (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003; BAKER, 2004). Nesse sentido, a diminuição do tamanho de poros exige aplicação de maiores pressões para a manutenção do fluxo de permeado.

A classificação dos tipos de membranas ocorre, também, pela distribuição dos tamanhos de poros. Para Baker (2004), membranas de MF possuem poros no intervalo de 0,05 – 10 µm sendo necessária aplicação de, no máximo, 2 bar de pressão, enquanto Harbert, Borges e Nobrega (2003) descrevem um intervalo de 0,1 – 10 µm e pressão máxima de 3 bar. Ou seja, os limites dos tamanhos dos poros para cada tipo de membrana variam conforme os autores, mas, em geral, membranas de MF variam de 0,09 a 10 µm, UF 0,002 a 0,1 µm, NF 0,0008 a 0,005 e OI menor que 10 Å (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003; LI, FANE, *et al.*, 2008).

2.2.1.3 Mecanismos de separação

Os mecanismos de separação também dependem do tipo da membrana, mais especificamente da presença de poros e de suas conformações. De acordo com Mallevialle, Odendaal e Wiesner (1996) ocorrem basicamente três tipos de separação: exclusão por tamanho (membranas de micro e UF), rejeição por diferença de solubilidade e difusividade (membranas de OI), assim como a separação baseada na diferença de cargas entres as espécies (membranas de eletrodiálise). Especialmente, para membranas de NF, ocorrem os três mecanismos, pois este tipo de membrana apresenta partes densas e porosas, bem como cargas em sua superfície (MALLEVIALLE, ODENDAAL e WIESNER, 1996).

2.2.2 Tipo de processo

Os PSM que utilizam gradiente de pressão como força motriz apresentam três possíveis correntes de processo (Figura 11): entrada ou alimentação do processo; concentrado, corrente com maior concentração de material particulado ou não-solvente; e o permeado, corrente na qual há maior parcela de solvente (JUDD e JEFFERSON, 2003).

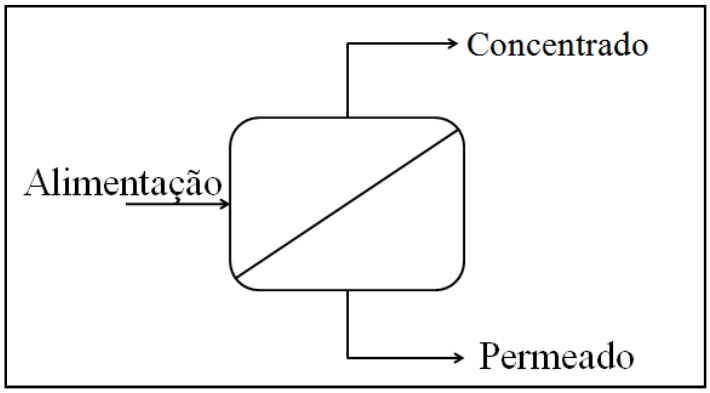


Figura 11. Correntes presentes nos PSM (Fonte: Autor)

Nesse sentido, o sistema apresentado na Figura 11 pode ser expresso através de cálculos de balanço de massa descritos nas Equações 2 e 3 (JUDD e JEFFERSON, 2003):

$$Q = Q_p + Q_c \quad (2)$$

$$Q \times C = Q_p \times C_p + Q_c \times C_c \quad (3)$$

Sendo:

- Q, Q_p e Q_c as vazões da alimentação, permeado e concentrado, respectivamente, e
- C, C_p e C_c as concentrações da alimentação, permeado e concentrado, respectivamente.

Diversos parâmetros são avaliados durante a operação de PSM com objetivo de controle e otimização dos processos, como o grau de recuperação (R_{ec}), a rejeição (R_{ej}), fluxo de permeado (J) e a permeabilidade (P).

O R_{ec} é calculado pela quantidade obtida de permeado a partir da alimentação (JUDD e JEFFERSON, 2003), como descrito na Equação 4.

$$R_{ec}\ (\%) = \frac{Q_p}{Q} \times 100 \quad (4)$$

A eficácia dos PSM pode ser medida pela R_{ej}, a qual mede a concentração do permeado relacionada à alimentação (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Assim, a rejeição é dada pela Equação 5.

$$R_{ej}\ (\%) = (1 - \frac{C_p}{C}) \times 100 \quad (5)$$

De acordo com Mulder (2000), J é definido pelo volume que passa pela membrana (V) por unidade de área (A) e tempo (t) (Equação 6). Entretanto, a permeabilidade (ϕ) é obtida através do fluxo pela pressão exercida (P) (Equação 7)

$$\mathbf{J} = \frac{\mathbf{V}}{\mathbf{A} \times \mathbf{t}} \quad (6)$$

$$\phi = \frac{J}{P} \quad (7)$$

Outra forma de avaliar os tipos de PSM, que utilizam gradiente de pressão como força motriz, é a partir de suas configurações de permeação: convencionais (“dead end”) ou filtração tangencial (“cross-flow”). Harbert, Borges e Nobrega (2003) explicam a diferença para os dois tipos de filtração, nos quais, quando há somente solvente, o fluxo de permeado deve ser constante para as duas operações. Segundo os autores, a presença de solução ou suspensão gera grandes diferenças nos parâmetros de operação de cada módulo. Isso ocorre pela presença de fenômenos intrínsecos ao sistema de filtração, como a polarização da concentração, e a deposição de material particulado na superfície da membrana, como o *fouling*.

A utilização de PSM que opera em *cross-flow* é vantajosa, pois diminui efeitos de incrustações, uma vez que o material depositado escoa paralelamente à superfície da membrana, tendo como principal mecanismo de separação a transferência de massa (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Ainda, de acordo com os autores, o sistema

dead-end potencializa os efeitos de incrustações, no qual a concentração na superfície da membrana aumenta com o tempo e, consequentemente, há a diminuição do fluxo de permeado (mais intenso quando comparado ao sistema *cross-flow*) sendo a principal operação de separação o modo transiente.

Para a aplicação do PSM, é necessário que haja, também, um estudo sobre a conformação dos módulos que será utilizada no sistema. Nesse sentido, as membranas podem ser divididas pela conformidade apresentada em diversos módulos: placa-quadro, tubular, espiral e fibra oca (NOBLE e STERN, 1999; BAKER, 2004). A membrana do tipo fibra oca e espiral é muito utilizada em escala industrial, por ser específica para altas vazões, ocupar menos espaço e apresentar menor propensão a incrustações e *fouling* (NOBLE e STERN, 1999; CARTAGENA, KADDOURI, *et al.*, 2013; GARCIA, MORENO, *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-MOZAZ, RICART, *et al.*, 2015).

Diferentemente, as do tipo placa-quadro, normalmente são empregadas em escala de bancada por apresentarem maior facilidade de adaptação do equipamento (YANGALI-QUINTANILLA, SADMANI, *et al.*, 2009; LINARES, YANGALI-QUINTANILLA, *et al.*, 2011; LIU, ZHANG, *et al.*, 2014; SHANMUGANATHAN, JOHIR, *et al.*, 2015)

2.2.3 Osmose Inversa

Em OI são empregadas membranas semipermeáveis, nas quais a pressão exercida deve ser maior que a pressão osmótica da alimentação, favorecendo a passagem do solvente pela membrana para a região de menor concentração (NOBLE e STERN, 1999). A Figura 12 demonstra o fenômeno osmótico direto, no qual o solvente tende a passar para a região de maior concentração, e o inverso, onde é aplicada pressão maior que a osmótica, concentrando a alimentação.

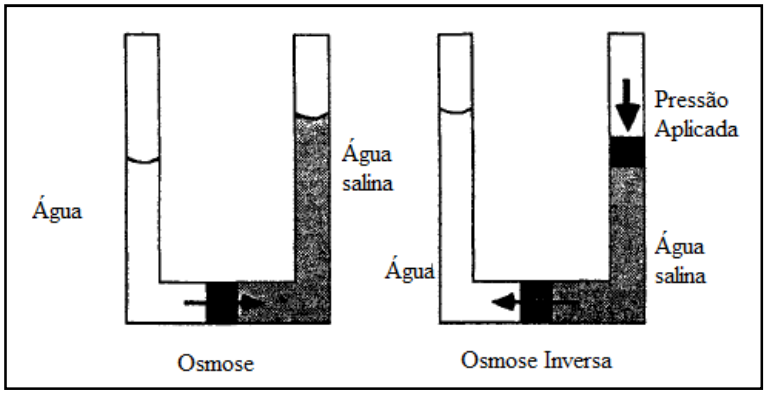


Figura 12. Esquema do fenômeno osmótico e da OI (Adaptado de NOBLE e STERN, 1999)

Os processos de OI empregam membranas cuja morfologia é densa, conferindo alta retenção de partículas de baixa massa molar, como sais inorgânicos e moléculas inorgânicas como a glicose (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Nesse sentido, são selecionadas, principalmente, para tratamentos de efluentes que visem reúso e dessalinização da água do mar, como etapa final do processo (LI, FANE, *et al.*, 2008). Os principais empregos de membranas de OI estão relacionados na Tabela 12.

Tabela 12. Principais aplicações de membranas de OI (Adaptado de LI, FANE, *et al.*, 2008)

Indústria	Água ultrapura, água de resriamento e água de processo
Água de consumo	Dessalinização da água do mar e água de injeção
Efluentes	Agricultura, água de consumo indireto e reúso

Certas dificuldades operacionais, atreladas à estabilidade dos módulos das membranas, são os principais problemas detectados por operadores de plantas industriais que empregam sistemas de OI, como: *fouling* e deterioração da superfície da membrana (LI, FANE, *et al.*, 2008).

O *fouling* na membrana de OI pode ocorrer por via química ou biológica, assim como por precipitação de sais. *Fouling* químico é causado pela adsorção de materiais orgânicos (geralmente ácidos húmicos) na superfície da membrana, a qual pode ser sintetizada por material polimérico (poliamida, por exemplo) hidrofóbico e com propriedades iônicas (LI, FANE, *et al.*, 2008). Essa adsorção química, ocasionada pela presença de orgânicos, modifica a estrutura interna das membranas, na qual os espaços intermoleculares são preenchidos por

componentes hidrofóbicos diminuindo o efeito difusivo da água e facilitando a passagem de compostos de elevados Log K_{ow}.

Microrganismos também podem adsorver em membranas de OI por afinidade eletrostática ou hidrofóbica, caracterizando o *fouling* biológico (LI, FANE, *et al.*, 2008). Outro caso, no qual há este fenômeno, é a propagação de microrganismos na superfície da membrana pela presença de nutrientes em maiores concentrações nessa região e pela deposição de material extracelular (LI, FANE, *et al.*, 2008).

A passagem de água para a corrente permeado gera aumento gradual da concentração de íons na região que está em contato direto com a superfície da membrana, ultrapassando o limite de solubilidade (BAKER, 2004). Esse fenômeno é conhecido como *scaling*, no qual há precipitação de sais na superfície da membrana de OI, comprometendo o fluxo de permeado do processo (BAKER, 2004).

Diversos tipos de matéria-prima podem ser empregados para sintetizar membranas de OI, contudo, os materiais que possuem empregabilidade comercial são: acetato de celulose, triacetato de celulose e poliamida. As membranas de acetato de celulose foram as primeiras a serem fabricadas para OI, fornecendo altas rejeições de sal no processo de dessalinização da água do mar. Contudo, não podiam operar a altas pressões, temperaturas e variações de pH (PORTER, 1998). Nesse sentido, membranas mais resistentes de triacetato de celulose foram desenvolvidas a fim de se trabalhar em condições mais amplas (PORTER, 1998).

As membranas de poliamida, consideradas como compostas de filme denso, diferem das outras duas pela possibilidade de se trabalhar em amplas faixas de pH, temperatura e pressão mantendo-se o fluxo de permeado. Contudo, possuem menor resistência a reações de degradação com o cloro (PORTER, 1998). A pequena variação do fluxo de permeado está relacionada à camada fina e densa (400-1.000 Å) e ao suporte poroso, normalmente, de polisulfona (PORTER, 1998).

2.2.4 Emprego de Osmose inversa para remoção de micropoluentes em esgotos sanitários

A remoção de micropoluentes por processos com membranas tem sido objeto de investigação, especialmente as de OI e NF que conseguem reter espécies de até 1 a 10 Å, respectivamente (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Isso ocorre, pois a maioria dos micropoluentes possui tamanhos de 200 - 400 Da (SUI, HUANG, *et al.*, 2010). Quando se compara a eficiência de remoção de membranas de OI e NF, percebe-se que as primeiras conseguem reter um maior número de micropoluentes, por serem consideradas densas (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003). Entretanto, as membranas de NF possuem outras especificidades que viabilizam seu uso, como a eficiência de retenção bem próxima às de OI, a possibilidade de se trabalhar com maiores vazões e/ou menores pressões, menor incidência do fenômeno *fouling* e por serem mais baratas (CARTAGENA, KADDOURI, *et al.*, 2013) (YANGALI-QUINTANILLA, SADMANI, *et al.*, 2009) (LIU, ZHANG, *et al.*, 2014).

A Tabela 13 apresenta diferentes trabalhos que abordam a remoção de micropoluentes, presentes em esgotos sanitários, por OI.

Tabela 13. Relação de trabalhos que abordam a remoção de micropoluentes, presentes em esgotos, por PSM

Autor	Escala	Condições	Micropoluentes	Remoção (%)
1	Planta piloto	**OI**, ULP-4040 (poliamida), Espiral, rec. 65%, fluxo de permeado 34LMH e **MF**, HF-66-43-PM500, Fibra oca, fluxo de permeado 323LMH	Azitromicina, Eritromicina, Ofloxacina, Sulfametoxazol, Trimetropina, Acetominofeno, Diclofenaco, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Ácido Mefenâmico, Naxopreno,etc	70-100
2	Planta piloto	**OI**, BW30-4040 (poliamida), Espiral, rec. 15%, 7,5bar, vazão permeado 120L/min, recirculação 25% e **NF**, NF90-4040 (poliamida), Espiral, rec. 15%, 5,5Bar, vazão permeado 120L/min, recirculação 17% e **BRM**, MF, Fibra oca	Acetominofeno, Ibuprofeno, Cafeína, Nicotina, Carbamazepina, Diclofenaco, Triclosano, 4-octilfenol, 4-t-octilfenol, BisfenolA	50-100
3	Planta piloto	**OI**, RE8040-FL (poliamida), rec. 72,6%, fluxo 82m³/d e UF, P75R (PVDF), fluxo 227m³/d	Atenolol, Carbamazepina, Cafeína, Diclofenaco, Dilantina, Florfenicol, Sulfametoxazol	19-99
4	Industrial // Piloto	**OI**, rec. 73%, vazão permeado 1200m³/d e **MF**, rec. 86%, vazão permeado 1640m³/d, vazão alim. 1910m³/d //**OI** (HR-4040 e LE-4040) e **NF** (NF270-4040), rec. 12-15%, vazão permeado 9.5-11m³/d, 5-11.8 Bar e **BRM**, Fibra oca	EDTA, Nonilfenol, E1, E2, EE2, Tributiltina, Naftaleno, Ibuprofeno, Ofloxacina, Oxitretacico, Eritromicina, Propanolol, Fluoxetina, etc	15-99

Continuação Tabela 13

Autor	Escala	Condições	Micropoluentes	Remoção (%)
5	Planta piloto	**OI**, TR70-4021 (poliamida), 10bar, fluxo 179,35±1,28L/h; e **BRM**, TRH=12,5h, idade lodo 45dias	Codeína, Hidrocodona, Carbamazepina, Diazepam, Famotidina, Ranitidina, Azitromicim, Claritromicina, Eritromicina, Sulfametoxazol, etc	99
6	Planta piloto	**OI**, (poliamida), rec. 21%, 7bar, fluxo 12L/m².h	Amoxicilina, Atenolol, Butalbital, Cafeína, Carbamazepina,Dilantina, Iohexal, Iopromida, etc	95-100
7	Bancada	**NF**, NF90 e NF270, 5bar; **OI**, XLE, BW30 e SW3O, 7-55bar. Em batelada, vazão conc. 3-4L/min, vazão permeado 40-100mL/h	Carbamazepina e Diatrizoato	41-100
8	Bancada	**OI**, BW30 (poliamida), Folha-plana, 15Bar, fluxo permeado 1,6mL/min, fluxo conc. 80mL/min, fluxo 7LMH, recuperação 2%; e **OI** (poli-metil metacrilato), Folha-plana, recirculação 50mL/min.	1,4-dioxano, Acetominofeno, Metronidazol, Fenazona, Cafeína, Bisfenol A, Carbamazepina, EE2, Ibuprofeno, Naxopreno, Fenoprofeno, Gemfibrosil, Ketoprofeno	40-100
9	Planta piloto	**OI**, TW30-2540 e BW30-400, rec. 80-90%, fluxo 22-45m^3/h, 8,7-12Bar; **BRM**, UF, ZeeWeed-1000 e ZeeWeed-500, fluxo 10-47 lmh, 6-24kPa, idade do lodo 40dias	Ácido Salicílico, Ibuprofeno, Bisfenol A, Diclofenaco, Colesterol, Sulfametoxazol, Sulfametazina, Trimetoprim, Eritromicina, Claritromicina, Roxitromicina	93-99

Continuação Tabela 13

Autor	Escala	Condições	Micropoluentes	Remoção (%)
10	Industrial	**OI**, (poliamida), fluxo 1,3m³/h, rec. 75-80%, 0,04-0,06MPa; **MF** e **UF**, ZeeWeed1000 (PVDF), fluxo 23L/m²h – 80000m³/dia	Cloranfenicol, Ácido Nalidixico, Trimetoprim, Bezafibrato, Ácido Clofíbrico, Genfibrozil, Diclofenaco, Indometacina, Ketropofeno,etc.	50-90

(1)Rodriguez-Mozaz et al. (2015) ; (2) Cartagena (2013); (3) Chon, Cho e Shon (2013); (4) Garcia et al. (2013); (5) Dolar et al. (2012); (6) Lee, Howe e Thomson (2012); (7) Gur-Reznik (2011); (8) Linares et al. (2011); (9) Sahar et al. (2011); (10) Sui et al. (2010)
Bioreator de Membranas (BRM)

A seletividade da membrana pode estar relacionada aos seguintes mecanismos: exclusão por tamanho, repulsão eletrostática, adsorção, difusão, interação soluto-soluto e *fouling*. Simom et al. (2009) avaliaram a adsorção do ibuprofeno em membranas de NF e OI e verificaram que esse fenômeno está diretamente ligado à repulsão eletrostática entre o poluente e a membrana, bem como ao pH da solução. Ou seja, a diminuição do pH para valores abaixo do pKa do ibuprofeno leva à diminuição da repulsão eletrostática, pois este torna-se carregado positivamente. Dessa maneira, há a facilitação da adsorção no interior da membrana, cuja carga superficial é negativa.

Shanmuganathan et al. (2015) complementam que, em sua pesquisa, obtiveram maiores remoções (97%) dos compostos iônicos perante aqueles não-iônicos (82%) para membranas de NF e OI. Assim, pelo fenômeno de difusão, as substâncias adsorvidas pela membrana têm sua eficiência de remoção diminuída.

Para Sahar et al. (2011), o fármaco diclofenaco foi removido por membranas de OI (carga superficial negativa) a rejeições superiores a 95% motivadas pela repulsão eletrostática entre a membrana e o micropoluente. O mesmo efeito é verificado quando se analisam outros fármacos e produtos de cuidado pessoal além do diclofenaco, cujas cargas são negativas quando em solução, como o ibuprofeno, glimepirida, naxopreno e sulfametoxazol (CHON, KYONGSHON e CHO, 2012).

Quando comparada aos micropoluentes, que possuem cargas neutras ou positivas, a eficiência de remoção diminui consideravelmente, como, por exemplo, o naxopreno, cuja carga é negativa e obteve-se remoções próximas a 100% e o acetominofeno (neutro) e o atenolol (positivo), cujas eficiências de remoção foram de aproximadamente 20% e 60%, respectivamente, para a mesma membrana (CHON, KYONGSHON e CHO, 2012).

Para Gur-Reznik et al. (2011), no entanto, algumas substâncias pouco hidrofóbicas e que possuem elevado pKa, como a carbamazepina e o diatrizoato, a adsorção em membranas de NF e OI é negligenciável e o mecanismo atuante, neste caso, é a exclusão por tamanho. Linares et al. (2011) confirmam essa possibilidade indicando que compostos hidrofílicos com cargas neutras são pouco adsorvidos quando não há presença de *fouling*. Cartagena et al. (2013) relatam o mesmo fenômeno, confirmando que neste caso quanto maior é o valor de Log K_{ow}, melhores são as rejeições obtidas.

Em contrapartida, Chon, Kyongshon e Cho (2012) analisaram o sulfametoxazol (hidrofílico) e verificaram que essa adsorção deve ser considerada, pois mesmo sendo uma substância com carga negativa, quando em solução, apresenta baixa eficiência de remoção. Ainda de acordo com os autores, micropoluentes que possuem cargas neutras, mas

apresentam alta hidrofobicidade, revelam altas eficiências de remoção quando se utiliza membranas de NF, cuja carga superficial é negativa.

Assim, os micropoluentes podem ser separados em alguns grupos conforme seus valores de pKa e log K_{ow}: compostos neutros hidrofílicos, neutros hidrofóbicos, iônicos hidrofílicos e iônicos hidrofóbicos (YANGALI-QUINTANILLA, SADMANI, *et al.*, 2009). Neste sentido, para uma membrana hidrofílica e de carga negativa, o fenômeno *fouling* ajuda a reter mais facilmente espécies neutras hidrofóbicas (pois a torta formada na superfície da membrana serve como uma barreira adicional) e iônicas hidrofílicas (por causa da repulsão eletrostática); e adsorve mais facilmente compostos neutros hidrofílicos e iônicos hidrofóbicos (LINARES, YANGALI-QUINTANILLA, *et al.*, 2011).

Diferentes tipos de materiais são utilizados na produção de membranas, contudo as membranas poliméricas são as mais empregadas para remoção de micropoluentes em águas e efluentes, pois estas possuem menores custos, são bastante versáteis quanto à conformação e possuem elevado desempenho de separação (HARBERT, BORGES e NOBREGA, 2003; BAKER, 2004; NOBLE e STERN, 1999; PORTER, 1998; LI, FANE, *et al.*, 2008).

Para a remoção de micropoluentes, a maioria dos autores utiliza membranas cujos materiais são específicos para a remoção de determinadas substâncias, por exemplo, os testes que aplicam membranas de poliamida (Tabela 13). Esse tipo de membrana possui carga negativa quando em contato com matrizes de pH neutro, aumentando assim a retenção de compostos de carga negativa. Outros tipos de membranas também são utilizados para diferentes objetivos como as de acetato de celulose, que são muito empregadas em matrizes que possuem alta concentração de cloro e atingem percentagens de até 99,5% na remoção de sal no processo de dessalinização (BAKER, 2004). Contudo, de acordo com Klüpfel e Frimmel (2010) membranas de OI, produzidas com acetato de celulose, não apresentam remoções satisfatórias de metramitorn, ácido clofíbrico, atrazina e terbutalina.

Alguns autores investigaram a remoção de micropoluentes por PSM em escala industrial. Sui et al. (2010) analisaram 14 compostos em quatro ETE localizadas em Pequim, China. De acordo com os autores, todos foram detectados nos afluentes das estações, sendo os mais abundantes a cafeína (3,4-6,6 $\mu g\ L^{-1}$) e o DEET (0,6-1,2$\mu g\ L^{-1}$). Contudo, observaram também que a ETE, a qual possui um sistema de tratamento terciário, baseado em membranas de MF e NF, fornece remoções maiores que 90% para a maioria dos compostos analisados. Os únicos compostos fracamente removidos foram a cafeína (50-80%) e o ácido mefenâmico (0-50%).

Com os mesmos tipos de membranas, Al-Rafai, Khabbazb e Schäferc (2011) analisaram 13 micropoluentes, entre desreguladores endócrinos e compostos farmacêuticos. Destaque, neste caso, para o ácido salicílico, ibuprofeno e o bisfenol-A, os quais mostraram as maiores concentrações (6,3 - 38,5 μg L^{-1}) no afluente da ETE. Apesar das altas concentrações, somente o último não foi removido eficazmente, apresentando concentrações no permeado de 20 – 464 ng L^{-1}. Ainda, de acordo com os autores, o PSM conseguiu aumentar, em uma ordem de grandeza, a remoção dos micropoluentes, quando comparados a respostas obtidas de outros trabalhos, considerando somente o tratamento primário e secundário. Ou seja, o emprego de PSM é eficaz para a remoção desses compostos e passa a ser recomendado para um possível reúso.

Garcia et al. (2013) avaliaram a remoção de 20 micropoluentes em uma ETE equipada com tratamento terciário de MF e OI, em sequência, e apenas o ibuprofeno e o nonilfenol não foram eficientemente removidos (<30%) perante a elevada remoção das outras substâncias (>75%). Nesse sentido, optaram por estudar a remoção daqueles, em uma planta-piloto, a qual possui um sistema de Biorreator de Membranas (BRM) seguido de um sistema de PSM, alternando com membranas de NF e OI. Nessa nova etapa, os autores obtiveram remoções maiores que 99%, o que os levou à conclusão de que o estado de deterioração da membrana implica diretamente na remoção de micropoluentes (no caso da planta da ETE, o PSM opera com uma idade de 30 dias, enquanto na planta-pilo as membranas eram “virgens” e operadas por poucas horas).

O estudo da eficiência de novos processos em escala piloto é de grande valia, pois possibilita a prevenção de possíveis riscos de operação, bem como a extrapolação dos custos para a escala industrial (NOBLE e STERN, 1999; YANGALI-QUINTANILLAA, MAENG, *et al.*, 2010). Nesse sentido, são diversos os estudos que abordam o tratamento de efluentes, nesta escala, e é crescente o número de trabalhos que avaliam a remoção de micropoluentes (Tabela 13).

Dolar et al. (2012) investigaram a remoção de alguns micropoluentes por OI após BRM e observaram que o emprego do PSM após o sistema biológico conseguiu remover todos os compostos alvos abaixo do LQ. Da mesma maneira, Cartagena et al. (2013) obtiveram resultados promissores (aproximadamente 99%) para a remoção de diversas classes de micropoluentes após a passagem por membranas de NF e OI. Corroborando os dois autores, Rodriguez-Mozaz et al. (2015) alcançaram concentrações menores que 16 ng L^{-1} em um sistema acoplado de membranas de UF e OI. Assim, de acordo com os autores, a utilização do PSM para a remoção de micropoluentes pode ser fortemente recomendada, pois

diferentemente dos POAs, não há formação de concentrado e serve também como barreira para possíveis microrganismos vindos do sistema biológico anterior.

Chon, Kyongshon e Cho (2012) propuseram um sistema de tratamento que visasse à remoção de micropoluentes de efluente de ETE após o tratamento primário. Nesse estudo utilizaram o processo de BRM combinado à NF. Os autores verificaram que compostos biodegradáveis e/ou hidrofóbicos foram removidos com alta eficiência pelo MBR. Contudo, os recalcitrantes e hidrofílicos foram removidos somente pelas membranas de NF (NF40, NF70 e NF90) com eficiências de aproximadamente 90% para diclofenaco, o qual é muito pouco removido por BRM.

Entretanto, Sahar et al. (2011) compararam a remoção de 11 micropoluentes por OI após dois tipos de sistemas: BRM e LAC/UF (sistema híbrido de Lodos Ativados convencional e membranas de UF). Os autores chegaram à conclusão de que, mesmo havendo alta eficiência de remoção (> 93%), ainda foram encontrados vestígios dos compostos analisados na corrente do permeado (28 – 223 ng L^{-1}), em decorrência da adsorção na membrana. Essas concentrações a níveis de traços sugeriram que o emprego de OI não é efetivo e que se deve buscar outros processos como adsorção em carvão ativado e processos oxidativos avançados.

Yangali-Quintanillaa et. al. (2010) compararam a eficiência e o custo/benefício na remoção de diversos micropoluentes orgânicos por dois tipos de PSM: OI (BW30 e ESPA2) e NF (NF200 e NF90). Usando efluente sintético com a inserção de micropoluentes selecionados em escala de bancada, os autores chegaram à conclusão que, para as membranas do tipo NF90, os compostos neutros tiveram maior eficiência de remoção (>82%). Contudo, para poluentes com carga, a rejeição foi maior, principalmente quando se utilizou a membrana NF90 (95%), em detrimento da NF200.

Ainda segundo os autores, os testes feitos em planta-piloto e em escala industrial, com membranas de OI, apresentaram resultados similares quando se utilizou as membranas de NF, alcançando patamares de aproximadamente 90% de rejeição. Ou seja, a NF pode ser comparada à OI em termos de eficiência de remoção de diversos poluentes emergentes e em termos de custo/benefício, pois a primeira é mais barata que a segunda (YANGALI-QUINTANILLAA, MAENG, *et al.*, 2010)

Para o estudo da remoção de micropoluentes, em amostras reais, por PSM, é necessário que haja caracterização da membrana, da matriz e do próprio micropoluente, bem como suas interações. Nesse sentido, algumas características do composto devem ser investigadas a fim de otimizar a sua remoção, como: concentração, tamanho e massa molar do

componente; pK_a; Log K_{ow} ; solubilidade em água; momento dipolo (forças interatômicas), conformação e eletronegatividade (SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011).

Desse modo, dependendo do composto, da matriz e da membrana empregada, diversos mecanismos de separação podem atuar no sistema, como demonstrado na Figura 13.

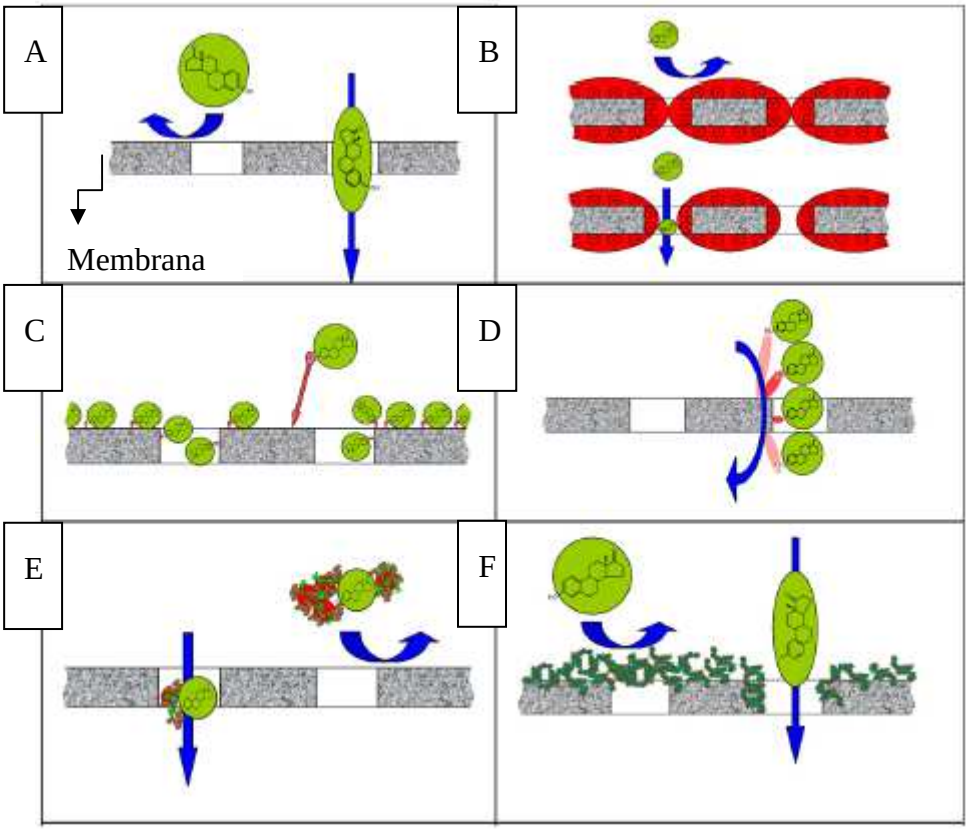


Figura 13. Mecanismos de retenção de micropoluentes em membranas poliméricas: (A) Exclusão por tamanho; (B) Exclusão por carga; (C) Adsorção; (D) Difusão; (E) Interações soluto-soluto; (F) Fouling (Adaptado de SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011)

A Figura 13 A apresenta o mecanismo de exclusão por tamanho, no qual partículas maiores que o tamanho dos poros (ou interstícios moleculares, no caso da OI) da membrana serão removidas. A Figura 13 B apresenta o fenômeno da repulsão elétrica, na qual moléculas que apresentarem ionização semelhante a da membrana serão repelidas. A adsorção e a difusão (Figura 13 C e D) são os fenômenos mais associados às membranas densas (SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011), pois, por não possuírem poros, o movimento no interior da membrana ocorre a nível molecular. A presença de *fouling* e as interações soluto-soluto (Figura 13 E e F) podem dificultar a previsão de remoção de micropoluentes, pois os

materiais retidos podem modificar a superfície da membrana e favorecer ou dificultar a passagem de orgânicos (SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011).

2.3 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

A oxidação é uma reação química que transforma um contaminante em uma forma mais oxigenada, por intermédio de agentes oxidantes, como o Oxigênio (O_2), Ozônio (O_3), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) ou Hipoclorito de Sódio (NaOCl) (The UV/Oxidation Handbook, 1994). Contudo, essas oxidações, consideradas simples, possuem baixo potencial de oxidação (E_0) comparadas aos oxidativos avançados que, geralmente, envolvem a formação de espécies oxidativas transientes, as quais reagem de forma não seletiva quando em contato com diversos compostos (USEPA, 1998). Assim, os Processos Oxidativos Avançados (POA) são processos de tratamento que operam à temperatura e pressão ambiente, envolvendo a geração de radicais hidroxil (·OH) (GLAZE, KANG e CHAPIN, 1987).

Por serem processos intrinsecamente destrutivos, os POA possuem capacidade desinfetante e, se operados em condições adequadas, conseguem a mineralização total de alguns contaminantes. Por esses motivos, têm sido amplamente empregados em indústria e águas destinadas ao consumo humano. Entretanto, possuem algumas desvantagens como: formação de subprodutos (alguns apresentam capacidade de gerarem efeitos mais relevantes que seus componentes primários), formação de bromatos e ácidos haloacéticos, se mal conduzidos, podem acontecer reações paralelas, nas quais pode haver o consumo dos agentes oxidantes (KOMMINENI, ZOECKLER, *et al.*, 2000).

Há uma grande variedade de espécies oxidativas, com alto $E_{0,}$ dispostos na literatura. Contudo, não são todos que podem ser empregados no tratamento de águas, por apresentarem certos riscos ao ambiente, à população e à operação em si. Na Tabela 14 são relacionados alguns oxidantes que podem ser utilizados para esse fim.

Tabela 14. Espécies oxidativas e seus respectivos potenciais de oxidação (MUNTER, 2001).

Espécies Oxidativas	E_0 (volts)
Cloro	1,00
Ácido hipocloroso	1,10
Permanganato	1,24
Peróxido de Hidrogênio	1,31
Ozônio	1,52
Dióxido de titânio carregado positivamente	2,35
Radical hidroxil	2,80

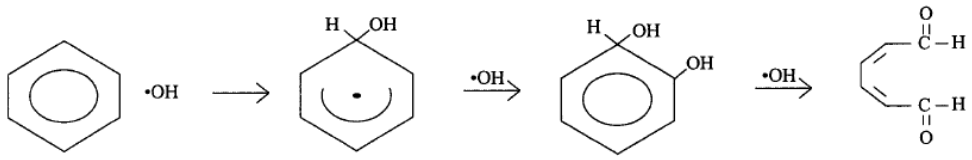
Destaque, neste caso, para o ·OH que possui alto E_0 (2.80) e reage rapidamente com os poluentes orgânicos (MUNTER, 2001). A Tabela 15 mostra algumas constantes da taxa de reação de ·OH com grupamentos orgânicos específicos.

Tabela 15. Constante da taxa de oxidação de radicais hidroxila com compostos orgânicos específicos (Adaptado de The UV/Oxidation Handbook, 1994).

Compostos	k (M^{-1} s^{-1})
Alcanos clorados	10^9 - 10^{11}
Fenóis	10^9 - 10^{10}
Orgânicos nitrogenados	10^8 - 10^{10}
Aromáticos	10^8 - 10^{10}
Cetonas	10^9 - 10^{10}
Alcoóis	10^8 - 10^{10}
Alcanos	10^6 - 10^9

De acordo com Kommineni et al. (2000), os POA envolvem, preferencialmente, dois estágios de oxidação: (1) formação de oxidantes fortes e (2) a reação desses oxidantes com contaminantes orgânicos na água. Após a formação dos ·OH, dois tipos de reações iniciais são propostos (The UV/Oxidation Handbook, 1994): abstração do átomo de hidrogênio, por exemplo, de alcanos ou alcoóis, para a formação de água (Equação 8); ou a adição de ·OH, em olefinas ou aromáticos para a abertura dos anéis (Equação 9).

$$CH_3OH + \cdot OH \rightarrow \cdot CH_2OH \xrightarrow{3 \cdot OH/O_2} CO_2 + H_2O \quad (8)$$



(9)

Contudo, quando não há degradação completa dos compostos orgânicos, as reações em cadeia podem se seguir conforme as Equações 10, 11, 12, 13 e 14 (MUNTER, 2001):

$$RH + \cdot OH \rightarrow H_2O + \cdot R \quad (10)$$

$$2 \cdot OH \rightarrow H_2O_2 \quad (11)$$

$$\cdot R + H_2O_2 \rightarrow ROH + \cdot OH \quad (12)$$

$$\cdot R + O_2 \rightarrow ROO \cdot \quad (13)$$

$$ROO \cdot + RH \rightarrow ROOH + R \cdot \quad (14)$$

Existem diversos processos que visam a geração de ·OH no ceio da solução. A Tabela 16 fornece os sistemas mais utilizados nos POA.

Tabela 16. Breve descrição dos POAs mais empregados na literatura (USEPA, 1998; KOMMINENI, ZOECKLER, *et al.*, 2000; POURAN, AZIZ e DAUD, 2015)

Processo	Descrição	Vantagens	Desvantagens
UV/H_2O_2	Oxidação sinérgica resultando na destruição de orgânicos. Maior número de radicais são gerados quando empregadas lâmpadas de UV de média pressão.	Sem formação de bromatos; desinfetantes; sem necessidade de tratamento de gases ou disposição de rejeitos; não há limite de transferência de massa.	Turbidez pode interferir na penetração de luz UV; menor eficiência de geração estequiométrica de ·OH; interferentes podem absorver a luz UV.
O_3/H_2O_2	Formação de ·OH pela combinação de O_3 e H_2O_2.	Eficiente no tratamento de águas; suplementar ao tratamento de desinfecção; mais efetivo que o O_3 e H_2O_2 sozinhos;	Potencial formação de bromatos; necessidade de destruidor de O_3 na saída do reator; necessidade de tratamento de destruição do H_2O_2 para evitar crescimento de microrganismos na linha de distribuição
O_3/UV	·OH são formados quando aplicada luz UV de baixa pressão a águas contendo O_3. A destruição de compostos orgânicos ocorre pelas reações radicalares, fotólise direta ou pelo O_3 de maneira seletiva.	Suplementar ao tratamento de desinfecção; mais efetivo que o O_3 e o UV sozinhos; mais eficiente na geração de ·OH comparado ao UV/H_2O_2 para iguais concentrações de oxidante.	Alto custo; formação de bromatos; Turbidez pode interferir na penetração de luz UV; transferência de massa limitada pela difusão do O_3; necessidade de destruidor de O_3 na saída do reator; interferentes podem absorver luz UV; pode haver contaminação de mercúrio pelo emprego das lâmpadas de UV.

Continuação Tabela 16

Processo	Descrição	Vantagens	Desvantagens
TiO_2/UV	Os elétrons da banda de valência são excitados à banda de condução, formando vacâncias. Essas vacâncias reagem com as moléculas de água para produzir radicais. H_2O_2 aparece como intermediário das reações.	Não há formação de bromatos; pode ser conduzido em diversos comprimentos de onda (diversos tipos de lâmpadas); não há necessidade de tratamento de gases.	Etapa de pré-tratamento para retirar materiais incrustantes; necessidade de separação se empregado diretamente no seio da solução; recuperação e reinjeção constante do catalisador; necessidade de dose ótima; pode requerer dispersão de O_2 para agitação; dependente do pH com constante monitoramento.
Fenton	Produção de radicais quando Fe^{+2} reage com H_2O_2 e passa a Fe^{+3}. Ferro atua como catalisador da reação.	Não há formação de bromatos; não há necessidade de emprego de elevada energia; não há emprego de sistema destruidor de gases.	Extração do ferro; manutenção do pH em 3,5 necessitando de maiores custos com soluções mantenedoras de pH.
Foto-Fenton	Combinação do processo Fenton com radiação UV-visível ($\lambda < 600$ nm) que promove $\cdot OH$ extras pela fotoredução do Fe^{+3} em Fe^{+2}	Reação mais rápida que o Fenton; menor utilização de ferro; menos geração de lodo; ação desinfetante; remoção de compostos recalcitrantes.	Extração do ferro; controle constante do pH em 3,5

2.3.1 UV/H_2O_2

A escolha por processos baseados na luz UV para a desinfecção de águas e efluente, vem crescendo desde os anos 90. Esta década foi marcada por alguns incidentes, nos Estados Unidos, envolvendo a utilização de cloro como agente desinfetante em águas de consumo. Houve relatos de elevados despejos de cloro e seus derivados na linha de abastecimento de algumas cidades e de vazamento de gases dos tanques de armazenamento, gerando efeitos deletérios, principalmente ao ambiente (LINSKY, 2000). Assim, a desinfecção promovida por sistemas de UV passou por um longo processo de modificações e implementações, sendo, nos dias atuais, bastante empregada em ETE e Estações de Tratamento de Águas (ETA), por ser um sistema intrinsecamente limpo (LINSKY, 2000). Nesse sentido, por se tratar de um processo mais acessível e por demonstrar bons resultados para a remoção de micropoluentes, o POA, tipo UV/H_2O_2, foi escolhido para ser empregado nesta dissertação.

Como exposto na Tabela 16, o emprego de UV/H_2O_2 oferece vantagens para a redução de matéria orgânica sem a necessidade de implementar, após o reator, etapa de tratamento de gases (como é o caso da aplicação do O_3). Assim, pode-se considerar que, dentre as tecnologias que envolvem luz UV, o emprego de H_2O_2 é mais eficiente e com menor custo, se operado adequadamente (MUNTER, 2001).

A formação de $\cdot$OH por UV/H_2O_2 ocorre de acordo com as Reações 15,16 e 17 pelo HO_2^- estar em equilíbrio químico com o H_2O_2 (MUNTER, 2001).

$$H_2O_2 \xrightarrow{h\upsilon} 2 \cdot OH \quad (15)$$

$$H_2O_2 \leftrightarrow HO_2^- + H^+ \quad (16)$$

$$HO_2^- \xrightarrow{h\upsilon} \cdot OH + O^- \quad (17)$$

2.3.1.1 Variáveis operacionais

Como variáveis operacionais do sistema UV/H_2O_2, pode-se destacar: concentração inicial de H_2O_2, tipo de lâmpada e sua intensidade, bem como a dose requerida, tempo de contato no reator, pH, temperatura, conformação do reator e concentração da matéria orgânica inicial (KOMMINENI, ZOECKLER, *et al.*, 2000; The UV/Oxidation Handbook, 1994).

De acordo com a USEPA (1998), a escolha do tipo de lâmpada de UV está diretamente relacionada à concentração de H_2O_2 necessária para atingir elevadas eficiências. Assim, uma lâmpada de baixa pressão, com emissão de comprimento de onda em 254 nm, necessitará de uma quantidade maior de H_2O_2 para gerar o mesmo efeito que uma lâmpada de alta pressão, cujo comprimento de onda pode ser ajustado à absorção característica do H_2O_2 (220 nm). Entretanto, altas doses de H_2O_2 podem favorecer reações secundárias pela captação de $\cdot OH$, diminuindo a eficiência do processo. Portanto, para a aplicação de UV/H_2O_2 com lâmpadas de baixa pressão é recomendável o estudo da melhor condição.

Dessa maneira, as primeiras variáveis que devem ser otimizadas são a dose de UV e a concentração de H_2O_2 (The UV/Oxidation Handbook, 1994). A dose de UV, quando aplicada ao POA, é a medida da energia elétrica total da lâmpada aplicada a um volume fixo de água (The UV/Oxidation Handbook, 1994). O cálculo depende da vazão, do tempo de residência, e da intensidade da luz UV. Para sistemas em batelada, considera-se o tempo exposto à luz, em contrapartida, para operação contínua, o fluxo.

Em sistemas contínuos, é necessário baixo fluxo no afluente, para aumentar a eficiência do processo (The UV/Oxidation Handbook, 1994). Contudo, a conformação do reator deve ser estudada de maneira a apresentar adequação ideal para se evitar gastos desnecessários (água próxima da lâmpada) ou subestimação do processo (água distante da lâmpada). Outro problema, que pode ser encontrado em sistemas de baixo fluxo, é o aquecimento da água e impossibilidade de despejo no ambiente, sendo necessário o emprego de trocador de calor.

Por fim, o pH deve ser ajustado de maneira a deslocar a Equação 16 no sentido de formação de H_2O_2, pois este, quando foto-degradado, gera um radical OH a mais (Equação 15) quando comparado ao HO_2^- (Equação 17). Dessa forma pH abaixo da neutralidade é considerado ótimo para esse tipo de reação.

Dependendo do afluente a ser tratado pelo processo UV/H_2O_2, é necessário o emprego de pré-tratamento visando à remoção de interferentes. Portanto, deve-se, primeiramente, caracterizar a corrente a ser tratada, através de análises como: Demanda Química de Oxigênio (DQO – diminui a eficiência do processo com a maior competição entre orgânicos pelo radical OH), alcalinidade (a presença de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos favorece o consumo de radical OH), turbidez (dificulta a penetração de luz UV), concentração de certos metais (dificulta a penetração de luz UV), como o ferro, Sólidos Suspensos Totais (SST - dificulta a penetração de luz UV), entre outros (The UV/Oxidation Handbook, 1994;

LINSKY, 2000). Os parâmetros e os respectivos valores que devem ser encontrados nos afluentes do processo UV/H_2O_2 estão listados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores mínimos de DQO, Alcalinidade, pH, SST e Ferro que deve conter um afluente de UV/H_2O_2.

Parâmetros	Valores máximos[(1)]
DQO (mg L^{-1})	100
Alcalinidade (mg L^{-1})	300
SST (mg L^{-1})	50
Ferro (mg L^{-1})	50
Abs_{254} (cm^{-1})	0,5

Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Totais (SST)
[(1)] (The UV/Oxidation Handbook, 1994)

Perante o exposto na Tabela 17, e havendo necessidade, alguns pré-tratamentos podem ser aplicados para a diminuição da contribuição específica de certos parâmetros, como: a filtração que pode ser fornecido pela filtração por areia ou emprego de membranas de MF (a escolha vai depender da relação custo/benefício) para remoção de SST; e a clarificação para a remoção de SST e/ou óleos e graxas (The UV/Oxidation Handbook, 1994)

2.3.2 Emprego de UV/H_2O_2 para remoção de micropoluentes em esgotos sanitários

O emprego de lâmpadas de UV em concomitância com H_2O_2 vem sendo amplamente estudado em água sintética e águas superficiais a fim de se avaliar a eficiência de remoção dos DE, bem como a detecção de produtos de degradação e a cinética envolvida (LAU, CHU e GRAHAM, 2005; ZHANG, FENG, *et al.*, 2010; PEREIRA, GALINHA, *et al.*, 2012; SOUISSI, BOURCIER, *et al.*, 2012; CARLSON, STEFAN, *et al.*, 2015).

Contudo, poucos são os trabalhos que abordam a remoção de micropoluentes presentes em esgotos sanitários, assim como a de DE. Isso ocorre pela dificuldade analítica perante a baixa concentração encontrada em matrizes ambientais e pela elevada presença de interferentes, os quais podem comprometer todo o processo e a análise. Nesse sentido, a Tabela 18 apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura que abordam a remoção de micropoluentes em efluente de ETE pelo emprego de UV ou UV/H_2O_2.

A fotólise de DE e/ou fármacos pode ocorrer de forma direta ou indireta, na qual a primeira advém da clivagem de ligações químicas das moléculas do micropoluente, na presença de luz UV; enquanto na segunda, moléculas distintas são excitadas pela luz UV, formando radicais livres, os quais irão degradar os microcontaminantes (AQUINO, BRANDT e CHERNICHARO, 2013).

Yan et al. (2015) estudaram a remoção de 27 micropoluentes, presentes em efluente de ETE, aplicando lâmpada de Xenon (150W) em um sistema de batelada. Os autores concluíram que a fotólise consegue degradar diretamente a maioria das substâncias estudadas (Estrona, Sulfametoxazol, etc.). Contudo, alguns microcontaminantes são mais persistentes, ou seja, a luz empregada não foi capaz de degradar de forma substancial (E2, E3, EE2, etc.).

Kim, Yamashita e Tanaka (2009) investigaram a remoção de 41 substâncias farmacêuticas pelo emprego de UV e de sua combinação com H_2O_2 em sistema contínuo. Os autores reportaram que, devido à baixa concentração de certos micropoluentes presentes nas amostras, a eficiência de remoção é baixa (67-69 %). Para componentes, cuja concentração foi acrescentada em 1000 vezes, no entanto, as rejeições foram maiores que 90%.

James, Germain e Judd (2014) conduziram, em planta-piloto, a oxidação por UV/H_2O_2 na remoção de diversos micropoluentes, dentre eles o E2 e EE2, em efluentes provenientes de ETE, após tratamento terciário de OI e/ou MF. Para todas as condições, os autores atingiram mais de 85% na remoção de micropoluentes, estando somente o Metaldeído (pesticida) abaixo de 50%. Os autores destacam, ainda, que os estrogênios apresentaram concentrações abaixo de 1 ng L^{-1} no efluente. A elevada eficiência do processo, perante o custo/beneficio gerado, permite a escolha, pelos autores, do sistema MF-OI-POA em detrimento do MF-CA-POA (utiliza Carvão Ativado ao invés de OI).

Tabela 18. Relação de trabalhos que abordam a remoção de micropoluentes presentes em efluente de ETE, por UV/H_2O_2

Autor	Escala	Concentração Inicial	Condições de Operação	Micropoluente	Remoção (%)
(1)	Bancada	1 - 10.000 ng L^{-1}	[H_2O_2] = 7,8 mg L^{-1}; λ = 254 nm; intensidade = 1,025 mW cm^{-2}; potência = 65 W; lâmpada de baixa pressão	Antipirina, Diclofenaco, Ketoprofeno, Isopropil, Naproxeno, Ácido Mefenâmico, Acetominofeno, Atenolol, Propranolol, Metoprolol, Clorotetraciclina, Norfloxacina, Sulfametoxazole, etc.	60-110
(2)	Industrial	9 - 2.781 ng L^{-1}	[H_2O_2]=0 - 50 mg L^{-1}, pH=7,0 - 7,42; λ=254 - 290 nm; tempo: 10-90 min	Ac. Mefenamico, Atenolol, Atrazina, Azitromicina, Benzafribato, Benzotriazole, Carbamazepina, Ciprofloxacina, Diclofenaco, Diuron, Genfibrozil, Ibuprofeno, Ketoprofeno, etc.	0-100
(3)	Planta piloto	0,2 - 2 µg L^{-1}	[H_2O_2] = 1 – 20 mg L^{-1}; Potência = 1,68 – 2,98 kWh; UV-T (%) = 65 – 98; λ = 254 nm; dose UV = 678 – 2026 mJ cm^{-2}	E1, E2, EE2, 2,4-D, Mecoprop, 2,4 5-T, Atrazina, Terbutrin, NDMA, Metaldeído	45-99
(4)	Bancada	0,26 – 1 mg L^{-1}	[H_2O_2] = 10 mg L^{-1}; lâmpada de média pressão	Carbamazepina	-

Continuação Tabela 18

(5)	Bancada	-	$[H_2O_2]$ = 0 – 20 mg L^{-1}; dose UV = 300 -700 mJ m^{-2}; tempo: 6 – 20 min; lâmpada de baixa pressão	Atenolol, Carbamazepina, Dilantin, Meprobamato, Primidona, Trimetopim	0-95
(6)	Bancada	3 – 10.380 ng L^{-1}	$[H_2O_2]$ = 20 – 50 mg L^{-1}; intensidade = 70 W m^{-2}; λ = 254 nm; potência 15W lâmpada de baixa pressão	Atrazina, Mecoprop, Bezafibrato, Gemfibrozil, Carbamazepina, Diclofenaco, Ketoprofen, Naxopren, Primidona, Atenolol, Metoprolol, Ciprofloxacin, Sulfametoxazol, Iomeprol, etc.	Média 88%
(7)	Bancada	200 µg L^{-1}	λ = 250 nm; potência 150 W, tempo: 0 – 480 min	E1, E2, E3, EE2, BPA, Gemfibrosil, Paracetamol, Diclofenaco, Ibuprofeno, Omeprazol, Carbamazepina, Diazepam, Eritromicin, Sulfadiazina, Sulfapiridina, Sulfametoxazol, etc.	-

Estrona (E1); 17β-Estradiol (E2); Estriol (E3); 17α-Etinilestradiol (EE2); Bisfenol-A (BPA)
(1) Kim, Yamashita e Tanaka (2009); (2) De La Cruz et al. (2012); (3) James, Germain e Judd (2014); (4) Keen et al. (2012); (5) Rosario-Ortiz, Wert e Snyder (2010); (6) De La Cruz et al. (2013); (7) Yan et al. (2015)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos dos processos de tratamento (PSM e POA) do efluente de ETE foram realizados no Laboratório de Tratamento de Águas e Reúso de Efluentes (LabTare), Escola de Química, UFRJ. Em contrapartida, as principais análises de atividade estrogênica (pelo método YES) e de cromatografia (CLAE) foram desempenhadas no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES), UERJ.

Como um breve resumo, a Figura 14 demonstra todas as atividades realizadas durante a dissertação. A descrição detalhada de todos os reagentes empregados, a matriz avaliada, o preparo e coleta das amostras, os métodos analíticos e os processos conduzidos, serão fornecidos nos próximos itens.

3.1 REAGENTES

Todos os solventes empregados nos ensaios YES e Cromatografia foram adquiridos com grau HPLC (pureza acima de 98%) da Tedia Brasil. Os hormônios E2, EE2 e E3 (grau de pureza de 99,8%), bem como os reagentes empregados no ensaio YES, foram obtidos da Sigma-Aldrich. O peróxido de hidrogênio foi adquirido da SUMATEX e o bissulfito de sódio da Vetec. O ácido clorídrico (HCl) grau P.A., da Merck. A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore®). O detergente utilizado para limpeza das vidrarias foi o Extran® neutro obtido da Merck.

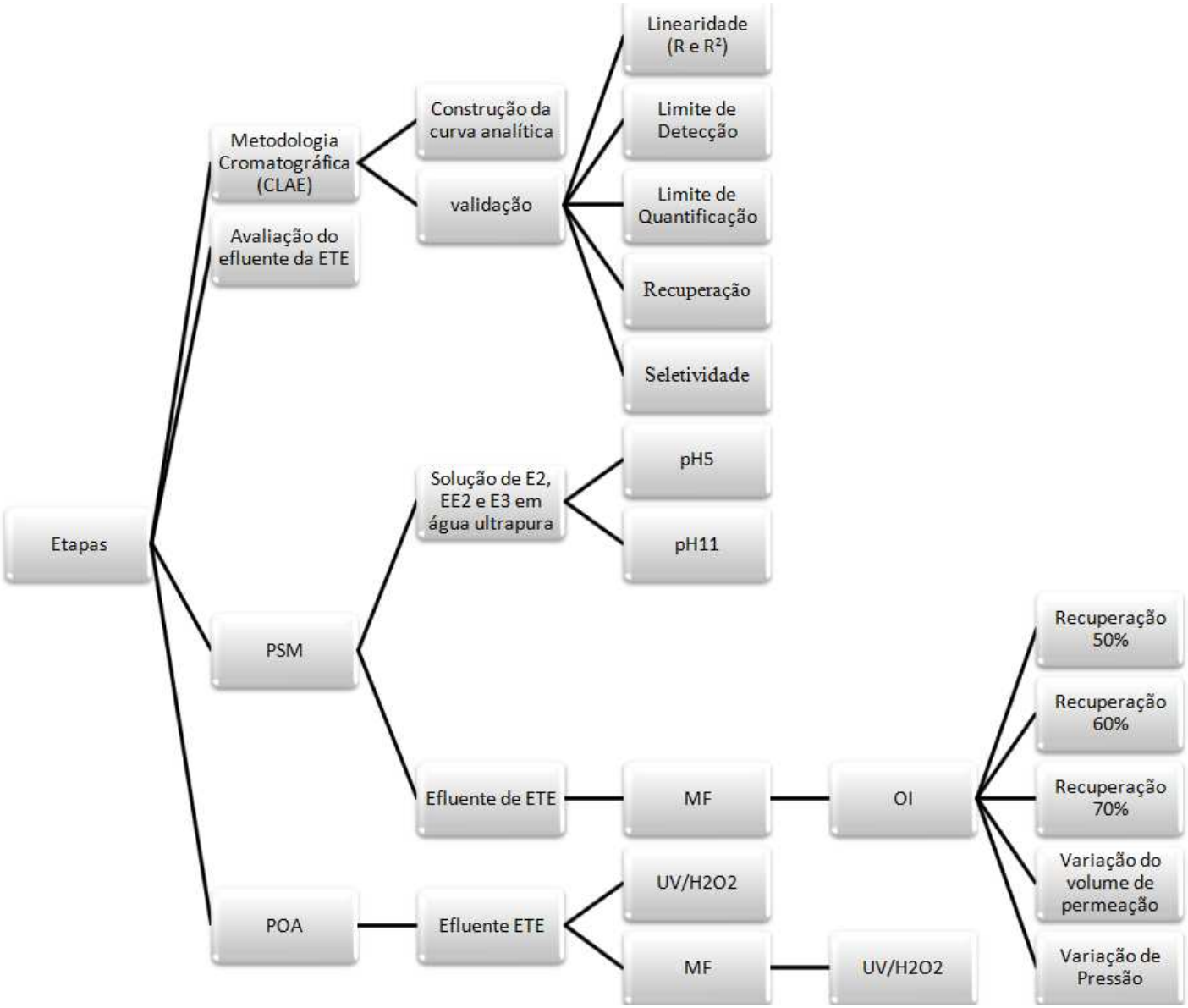


Figura 14. Esquema detalhado de todas as atividades realizadas.

3.2 MATRIZ AVALIADA

A matriz escolhida para a realização deste estudo foi o efluente produzido por uma ETE, após o decantador secundário, do processo de Lodos Ativados. A pedido da empresa, fornecedora do efluente, não será mencionada seu nome, assim como sua localidade específica, sendo referenciada como “ETE”, nas discussões seguintes, localizada na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

Os processos de tratamento, utilizados pela ETE, contam com: gradeamento, elevatória, caixa de areia, bioreator aeróbio (Lodos Ativados) e decantador secundário. Esse processo é típico dos empregados em diversas ETE do país.

3.3 LIMPEZA DAS VIDRARIAS

A limpeza para todas as vidrarias, que tivessem contato com as amostras destinadas às análises de atividade estrogênica e CLAE, foi realizada com base na metodologia descrita por Silva (2015), que consistiu em:

- Imersão, por no mínimo 24 horas, em solução 5% v/v de Extran;
- Lavagem com água, 10 vezes, para retirar o Extran;
- Enxague com Acetona;
- Lavagem com água ultrapura, 5 vezes;
- Enxague com Etanol (EtOH);
- Lavagem com água ultrapura, 3 vezes, e
- Secagem em estufa a 65°C, por período de 24 horas.

Todas as vidrarias foram envolvidas em papel alumínio, a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação e guardadas em ambiente separado das demais.

A limpeza do sistema de separação, no qual foram empregadas membranas de OI e MF, foi providenciada a partir das seguintes etapas:

- Enxague com solução 5% v/v de Extran;
- Lavagem com água em abundância;
- Enxague com Acetona;
- Lavagem com água ultrapura em abundância;

- Enxague com EtOH;
- Lavagem com água ultrapura em abundância;
- Passagem de 2 L de água ultrapura em todo o sistema, sem a presença de membrana, e
- Passagem de 2 L de água ultrapura em todo o sistema, com a presença de membrana.

A última etapa, referente à passagem de 2 L de água ultrapura com membrana, foi realizada momentos antes de se iniciar cada operação. As demais foram conduzidas logo após o término de cada filtração.

3.4 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas diretamente da saída do decantador secundário e armazenadas em garrafas âmbar de 2 L. As garrafas eram acondicionadas em isopores com gelo, a fim de se manter a refrigeração e preservação da amostra antes de serem estocadas em geladeira a 4°C.

Para aquelas que foram enviadas diretamente à análise, foi adicionado metanol, na proporção 1% v/v de amostra (20 mL de solvente em cada garrafa de 2 L), com o intuito de preservar os componentes de interesse. Já para as amostras enviadas aos processos, PSM e POA, não foi adicionado o solvente, com o objetivo de se reproduzir as mesmas condições da ETE.

A metodologia de filtração, extração e eluição foram baseadas na descrita por Silva (2015). Assim, todas as amostras, destinadas à CLAE e ao YES, foram previamente filtradas em membranas de fibra de vidro (1.2 µm - Merck) e de acetato de celulose (0.45 µm - Merck). Após, o pH foi ajustado para 2 com ácido clorídrico (HCl) 3 mol L^{-1}. Vale citar que todas as análises de pH, para ajustes de amostras referentes ao ensaio YES e à CLAE, foram realizadas por tira indicadora universal de pH (Merck), para evitar possíveis contaminações.

A extração foi a do tipo EFS, empregando-se o cartucho Strata-X (C_{18}) 500 mg / 6 mL, fabricado pela Phenomenex®, em Manifold Agilent - VacElut 12 - com a passagem de 500 mL de amostra. Esses tipos de cartuchos necessitam de ativação ou condicionamento prévio, que, neste caso, foi providenciado pela passagem de 6 mL de hexano, 2 mL de Acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura ácida (pH = 3, ajuste com HCl 3 mol L^{-1}). Deve-se

ressaltar o cuidado do operador, nessa etapa, para não haver contaminações entre amostras diferentes e a necessidade de se evitar a secagem do cartucho, o que pode comprometer a eficiência da extração.

Como descrito por Silva (2015), foi realizada, também, a etapa de *clean-up* no cartucho, para a remoção de interferentes. Consistia na passagem de 10 mL de solução contendo metanol e água ultrapura na relação de 1:9. Após, o sistema a vácuo continuou ligado por 10 minutos para secagem total dos cartuchos.

Como esse processo durava um período de no mínimo 4 horas, não era possível a realização, no mesmo dia, da etapa de eluição e secagem (duração mínima de 6 horas). Os cartuchos foram, então, estocados em *freezer*, a -20°C.

Em dias distintos ao da extração, foram feitas as eluições das amostras, que empregava a passagem de 4 mL de acetona nos cartuchos, em temperatura ambiente, pela ação da gravidade. O eluído caía diretamente em frascos de vidro de 10 mL e, após a passagem total, ligava-se bomba de vácuo para a secagem do cartucho.

Como os solventes do YES e da cromatografia eram diferentes, e não a acetona como usada nos procedimentos anteriores, houve a necessidade da mudança do meio das amostras eluídas nos frascos de vidro. Essa secagem foi realizada pelo emprego de bomba de vácuo no próprio Manifold (tiravam-se os cartuchos e ligava-se a bomba).

Logo após, as amostras para cromatografia e ao YES eram resuspendidas em 2 mL de acetonitrila (ACN) e 1 mL de EtOH, respectivamente.

Como a etapa de extração, além de remover interferentes, serve para a concentração dos analitos de interesse, todas as concentrações, obtidas através da CLAE e do YES, necessitaram de uma etapa de tratamento de dados, nos quais se recalculavam os valores para as amostras anteriores à extração.

Nesse sentido, nas Equações 18 e 19 são apresentados os cálculos para os valores corrigidos da cromatografia e do YES, respectivamente. R, $V_{res.}$, $V_{ext.}$ e ρ_{ACN} são a resposta obtida, o volume de ressuspensão, o volume de extração e a densidade da ACN, respectivamente.

$$[E_i] = \frac{R \times V_{res.} \times \rho_{ACN}}{V_{ext.}} \quad (18)$$

$$\text{Eq-E} = \frac{R \times V_{res.}}{V_{ext.}} \quad (19)$$

Cabe informar que somente para as análises da amostra sintética, destinadas à CLAE, o volume de resuspensão foi de 1 mL ACN, pois a possibilidade de interferentes era menor que nas amostras ambientais.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

As amostras provenientes da ETE e dos processos de tratamento (PSM e POA) foram analisadas por CLAE e atividade estrogênica, que serão discutidos mais detalhadamente nos itens posteriores.

Contudo, outros parâmetros também foram avaliados conforme dispostos na Tabela 19. Para esses, foram separadas alíquotas de cada amostra obtida, a fim de evitar contaminações provenientes de aparelhos de uso comum dos laboratórios. Vale ressaltar que o pH, para ajuste de amostras, foi medido por tira indicadora universal de pH (Merck). Para as alíquotas, previamente separadas e destinadas a CLAE e ao YES, os métodos utilizados para análise estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Métodos, Equipamentos e laboratórios para a realização dos parâmetros físico/químicos.

Parâmetros	Método*	Equipamento	Laboratório
COT[(1)(2)]	5310 B	Elementar Vario TOC Analyser	LabTare
H_2O_2 residual**[(2)]	Colorimétrico a 466 nm	Espectrofotômetro Hach DR - 2800	LabTare
Abs_{254}[(1)(2)(3)]	-	Shimadzu UV - 1800	LabTare
Condutividade[(3)]	2510 B	Condutivímetro	LabTare

*Referência: APHA, AWWA, WEF (2012); **Referência: Nogueira, Oliveira e Paterlini (2005).
COT = Carbono Orgânico Total;
[(1)]Caracterização do efluente da ETE; [(2)]Amostra POA; [(3)] Amostra PSM

3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os testes para análise dos estrogênios E2, EE2 e E3 foram realizados em cromatógrafo de CLAE da marca Breeze 2, fabricado pela Water's Corporation® (Figura 15). Este aparelho conta com: (A) amostrador automático; (B) recipientes para a fase móvel; (C) duas bombas pistão (fornecendo a possibilidade de se trabalhar com somente dois solventes), redutor de pulso, misturador de solventes, e degaseificador; (D) Detector de DAD-UV (este detector consegue gerar sinal em uma ampla faixa de comprimento de onda do ultravioleta, diferentemente de aparelhos de UV que operam somente em um comprimento de onda); (E) Detector de Fluorescência (possibilidade de trabalhar em série com o DAD-UV) e (F) Coluna cromatográfica.

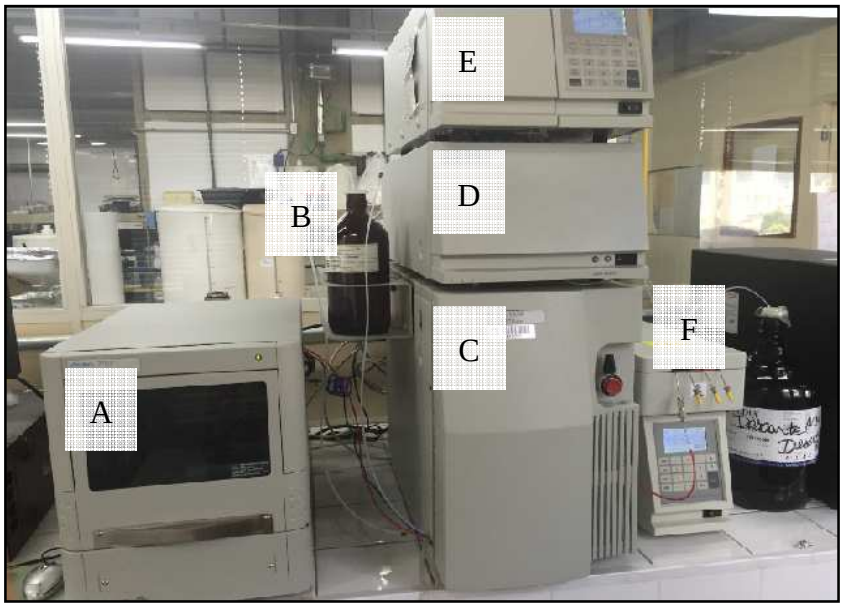


Figura 15. Aparelho de CLAE, marca Breeze 2 fabricado pela Water's Corporation®, utilizado dos testes analíticos. (A) Amostrador automático; (B) Fase móvel; (C) Bomba, misturador e degaseificador; (D) Detector de DAD-UV; (E) Detector de Fluorescência; (F) Coluna cromatográfica.

A metodologia implementada para detecção e quantificação de E2, EE2 e E3 baseou-se, primeiramente, no trabalho de Oliveira (2015) que empregava Novapak PAH (4,6 x 250mm, 5 micras) como coluna cromatográfica. Contudo, a metodologia implementada pelo autor não foi adequada para analisar os três estrogênios em uma mesma corrida. Nesse sentido, houve um aprimoramento do método, com o aproveitamento da mesma coluna, mas em modo gradiente de acordo com a Tabela 20.

Tabela 20. Metodologia baseada em modo gradiente: variação de solventes (ACN e $H_2O_{ultra\text{-}pura}$) com o tempo.

Tempo (min)	ACN (%)	$H_2O_{ultra\text{-}pura}$ (%)
Início	40	60
6	50	50
9	30	70
13	40	60
15	40	60

A temperatura da coluna foi fixada em 30°C e vazão de 1 mL min^{-1}. O volume injetado foi de 20 µL, em um Loop de 100 µL, com volume útil de 50 µL. Para detecção em fluorescência foi escolhido o comprimento de onda de 180 nm de excitação e 360 nm de emissão (OLIVEIRA, 2015). A temperatura do amostrador foi mantida em 18°C com o objetivo de fornecer o condicionamento das amostras e evitar possíveis degradações (OLIVEIRA, 2015).

Para validação do método descrito, este trabalho teve como parâmetro o guia sobre validação de métodos analíticos, fornecido pelo INMETRO (2010). Nesse sentido foram analisados a seletividade, os LD e LQ, linearidade e recuperação.

As curvas de calibração foram obtidas pela injeção de um padrão, contendo aproximadamente 50 µg L^{-1} de cada estrogênio, cuja diluição em cinco concentrações foi automaticamente proporcionada pelo aparelho. A Tabela 21 apresenta as concentrações de cada estrogênio para a respectiva diluição.

Tabela 21. Concentrações teóricas de E2, EE2 e E3 para construção da curva de calibração

Diluição (%)	E2 µg L^{-1}	EE2 µg L^{-1}	E3 µg L^{-1}
-	51,40	55,15	53,93
50	25,70	27,58	26,96
25	12,85	13,79	13,48
12,5	6,43	6,89	6,74
6,5	3,34	3,58	3,50

A linearidade foi determinada em função da curva padrão avaliando os valores de R e R^2 (INMETRO, 2010). De acordo com INMETRO (2010), o LQ foi obtido pela menor concentração da curva analítica e o LD, pela Equação 20, no qual t é a distribuição de *Student*, dependente da amostra e do grau de confiança e S é o desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição (no caso, houve 3 injeções fornecendo grau de liberdade igual a 2).

$$LD = 0 + t_{(n-1,1-\alpha)} \times S \qquad (20)$$

A seletividade e a recuperação foram verificadas em função de amostras coletadas após o decantador secundário da ETE, na presença de concentrações conhecidas dos três hormônios (Tabela 22), em programação de 5 injeções para todas as concentrações. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** demonstra o cálculo realizado para o teste de recuperação.

Tabela 22. Concentrações dos padrões de E2, EE2 e E3 nas amostras de efluente de ETE para os testes de recuperação e seletividade.

Padrões	Concentração ng L^{-1}			Concentração µg L^{-1}		
E2	29,41	73,52	107,04	2,02	8,09	20,21
EE2	27,43	68,57	137,14	2,59	10,37	10,37
E3	18,04	45,11	90,22	3,07	12,27	30,67

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração medida}}{\text{Concentração esperada}} \times 100 \qquad (21)$$

3.5.2 Ensaio YES

Esta tecnologia foi selecionada para quantificação de atividade estrogênica, de amostra de efluente de ETE, por causa de sua alta praticidade, sensibilidade e por detectar concentrações de E2 em ng L^{-1}. Todas as etapas, necessárias ao teste de atividade estrogênica, foram conduzidas a partir do ensaio YES desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996) e otimizado por Bila (2005) e Silva (2015).

Como este teste é altamente sensível a contaminações, todas as vidrarias foram previamente limpas (ver item 3.3) e usadas somente para este ensaio. O preparo da cepa, conforme explicado por Silva (2015), está disponível no Anexo I.

Todas as etapas do ensaio foram realizadas em capela de fluxo laminar, não havendo, em nenhum momento, a retirada de materiais ou reagentes.

3.5.2.1 Preparo do meio de análise

O meio de cultivo e de análise foram preparados consecutivamente em frascos de 250 mL, previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos. O meio de cultivo contava com: 25 mL de glicose, 2.5 mL de vitamina, 2 mL de Treonina, 625 µL de solução de Cobre e 225 mL de meio mínimo. O preparo das soluções foi descrito por Silva (2015) e está disponível no Anexo I.

Inicialmente, analisou-se a concentração de levedura em termos de absorbância a 620 nm. Este procedimento foi conduzido pela adição de 4 mL de meio de cultivo e 3 mL do cultivo da levedura (Anexo I), sendo necessária leitura na faixa de 0.8 a 1.0 para pronta utilização. Contudo, se a cultura estivesse abaixo desse valor, adicionavam-se pequenos volumes até atingir leitura de 0.8, caso contrário, eram realizadas diluições para alcançar leitura de 1.0.

Após atingir o valor de absorbância ideal, era preparado o meio de análise: 125 mL do meio de cultivo, 1.25 mL de CRPG e 125 µL do meio de cultura da levedura. O preparo dessa solução permitia a análise de 7 amostras mais o padrão E2, ou seja, 4 microplacas de 96 poços.

3.5.2.2 Preparo das microplacas de 96 poços

Para cada ensaio YES realizado, houve o preparo de uma microplaca para as diluições seriadas das amostras e outras 6, destinadas à bioreação.

Para o preparo da placa de diluição, obedeceu-se a seguinte sequência:

- Inserção de 100 µL de EtOH nas colunas 2 a 12;
- Introdução de 200 µL de amostra no primeiro poço de cada linha (coluna 1), e
- Diluição seriada (proporção 1:2) retirando 100 µL de cada poço, tendo, o último poço, 200 µL.

Após o preparo de uma amostra na placa de diluição, eram retirados rapidamente 10 µL das soluções preparadas em cada poço, com pipeta de multicanais, para evitar concentração por volatilização do EtOH, e inseridos nas linhas respectivas aos poços das amostras nas placas de biorreação. Como padronização, as linhas das amostras, nas placas de biorreação, eram referentes a A, C, E e G, sendo as linhas C e G replicatas das linhas A e E, respectivamente.

Para o preparo das placas de biorreação, respeitaram-se as seguintes etapas:

- Inserção de 10 µL de etanol nos poços relativos aos Brancos (linhas B, D, F H);
- Inserção de 10 µL das amostras diluídas, provenientes da placa de diluição;
- Secagem das placas de biorreação (duração de, aproximadamente, 40 minutos);
- Introdução de 200 µL do meio de análise em todos os poços secos;
- Vedação das laterais com fita adesiva;
- Agitação das placas em agitador de microplacas de 96 poços (IKA, MS-3) por 2 minutos, e
- Incubação por 72 horas em estufa a 30°C.

Para melhor entendimento, a Figura 16 mostra um esquema das microplacas de 96 poços e a padronização dos poços referentes às amostras (ou padrão) e aos brancos.

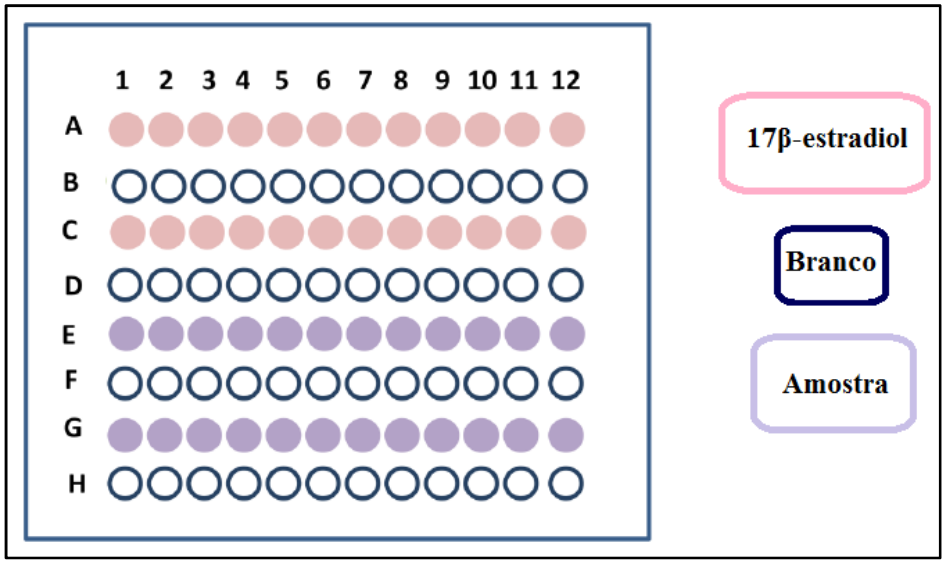


Figura 16. Esquema de uma microplaca de 96 poços. Linhas A e C referentes ao E2, E e G às amostras e B, D, F e H aos brancos (SILVA, 2015).

Após atingir o tempo de incubação, foi realizada a leitura nos comprimentos de onda de 575 e 620 nm, para medição de cor e turbidez, em espectrofotômetro de 96 poços (Softmax Pro5, SpectraMax M3).

A construção da curva de calibração (branco positivo) foi conduzida na mesma sequência que a descrita acima, contudo, nos poços relativos à amostra, foi inserida concentração conhecida de E2. A solução estoque de E2 possuía concentração de 54.48 µg L^{-1} e, a partir das diluições seriadas e da inserção de 200 µL de meio de análise nas placas de bioreação, obteve-se concentrações de 2724 a 1,3301 ng L^{-1} de E2 em cada poço, sequencialmente (SILVA, 2015).

A partir da leitura das absorbâncias, pôde-se calcular a Absorbância corrigida da amostra (A_{corr}) pela mudança de cor (A_{575am}), a qual considera a absorbância do branco (A_{620br}), relacionada com a contribuição da turbidez da levedura, e a absorbância da amostra relativa a turbidez intrínseca. A Equação 22 demonstra como foram realizados os cálculos de correção da absorbância:

$$A_{corr} = A_{575am} - (A_{620am} - A_{620br}) \quad (22)$$

Como a maioria das curvas dose-resposta das amostras, obtidas pela correção da absorbância, não apresentaram curva sigmoidal, decidiu-se trabalhar somente com as

concentrações de Equivalente Estradiol (Eq-E) da máxima indução de β-galactosidase, que é definido como a concentração de E2 requerida para elucidar a mesma resposta na amostra do ensaio YES (SILVA, 2015). A Equação 23 mostra o cálculo utilizado para obtenção do Eq-E, onde x é a concentração da substância estrogênica no ensaio, A_1 é a máxima indução da atividade estrogênica da amostra, A_2 é o LD do E2 (10,13 ± 3,65 ng L^{-1}) , x_0 é o valor de EC_{50} obtido pela curva sigmoidal do E2 e p é a inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta (SILVA, 2015).

$$\text{Eq-E} = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \qquad (23)$$

3.6 SISTEMA DE SEPARAÇÃO POR OSMOSE INVERSA

O PSM, empregado neste trabalho, visou o estudo da remoção de E2, EE2, E3 e atividade estrogênica, por membranas, tipo folha-plana, de OI, com uso comercial (BW30-4040, poliamida, DowFilmetec), em escala de bancada. Contudo, como a amostra de esgoto biotratado foi coletada diretamente do decantador secundário da ETE, foram observadas grandes concentrações de sólidos. Diante disso, foi adotado um pré-tratamento com membrana de MF (Mycrodyn Nadir, 0,05 µm) para retenção dessas partículas e, consequente, diminuição de problemas de depósitos e polarização da concentração (*fouling* e *biofouling*) na OI.

De forma a minimizar possíveis contaminações, foi desenvolvido, neste trabalho, sistema de separação *dead-end*, no qual todas as peças, que estavam em contato com o efluente, fossem de aço-inox. O sistema contava com: (a) cilindro de gás nitrogênio pressurizado, (b) dois manômetros (saída do cilindro de gás e na célula de separação), (c) célula de separação, com volume útil de 2 L, (d) canal de entrada da amostra, (e) canal de saída do concentrado, (f) canal de saída do permeado, (g) válvula de escape de ar, (h) agitador magnético - IKA® CG-MAG MS7 - e (h) balança analítica - Gehaka BK 3000 - (Figura 17).

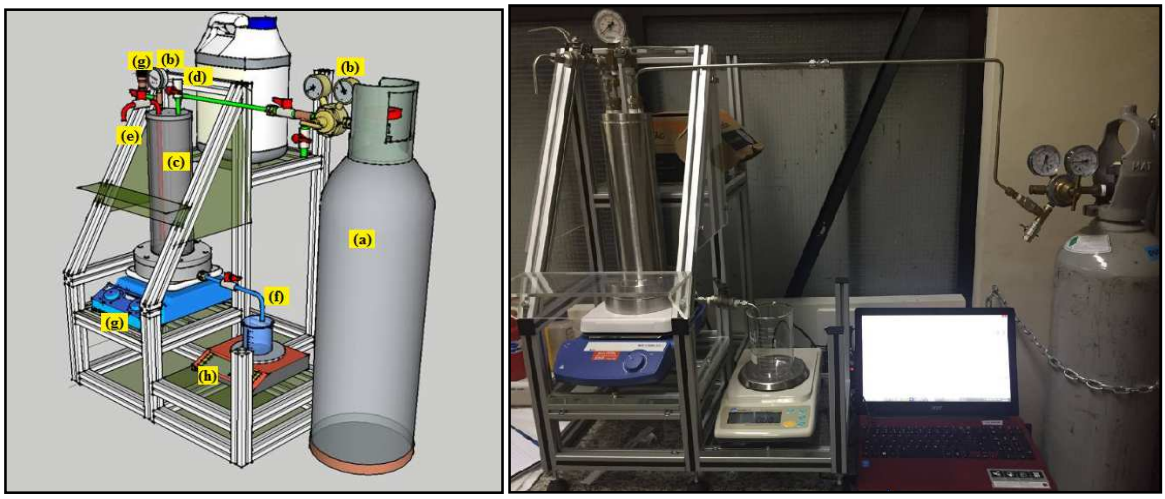


Figura 17. Sistema *dead-end* para PSM com membranas de MF e OI.

A parte interna da célula de separação englobava: espaçador de aço-inox acoplado à célula, sem contato direto com a membrana, de forma a possibilitar sua retirada para limpeza (Figura 18); barra magnética, para promover turbulência e mistura do concentrado, bem como a diminuição de problemas de incrustações; e suporte da membrana em meio poroso de aço-inox.

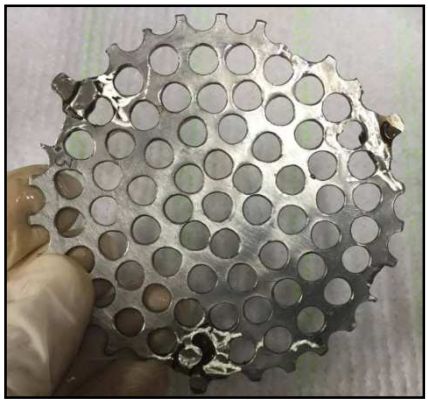


Figura 18. Espaçador de aço-inox entre a membrana e a barra magnética.

Os valores de tempo/massa, captados pela balança analítica, foram enviados diretamente a um computador, de forma a tratar os dados recebidos em 0,100 s/g, podendo, dessa forma, construir as curvas J x tempo de todos os processos conduzidos. Para a obtenção do J, seguiu-se a Equação 6 (descrita no capítulo de Revisão Bibliográfica), na qual a área efetiva de separação era de 86,5 cm^2. Para o volume, considerou-se a massa específica da água (1 g mL^{-1}), sendo cada grama, registrado pela balança, convertido para 1 mL de volume.

Os testes, para avaliação da remoção dos estrogênios e da atividade estrogênica, contaram, primeiramente, com a escolha do pH ideal para o processo, à pressão de 20 bar, de acordo com o que foi descrito por Heo et al. (2013). Nesse sentido, foram realizadas separações por membranas em solução de E2, EE2 e E3 em água ultrapura com dois pH diferentes, 5 e 11. As concentrações dos hormônios na solução para o processo de separação foi de 27,27, 29,95 e 765,59 ng L^{-1} para E2, EE2 e E3, respectivamente. A inserção dessas concentrações se baseou nas amostras adquiridas, anteriormente, para a validação da metodologia cromatográfica. A partir dos resultados obtidos, que serão discutidos no capítulo de Resultados e Discussão, foi decidido que não haveria ajuste de pH nas amostras de esgoto biotratado.

Após, o PSM, para as amostras de esgoto biotratado da ETE, foi conduzido de acordo com as seguintes etapas:

(1) Teste em diferentes recuperações (50, 60 e 70%) à pressão de 20 bar;
(2) Teste em recuperação de 70%, com volumes menores, à pressão de 20 bar, e
(3) Teste em recuperação de 70%, com volumes menores, à pressão de 10 bar.

Nas etapas (1) e (2), para cada condição, foram realizadas duas filtrações consecutivas e diferentes, na qual a primeira era destinada à geração de amostras para a CLAE e a segunda, ao YES. Dessa forma, as membranas de OI, provenientes da separação para a CLAE, foram reutilizadas para produção de alíquotas para o ensaio YES. Contudo, para cada condição diferente, foi empregada membrana nova. Isso foi necessário, pois as análises de cromatografia e atividade estrogênica requeriam um volume mínimo de 500 mL no concentrado, o que exigia 2,5 L para a entrada da OI, não sendo viável, portanto, a geração de 1 L no concentrado para a CLAE e YES, em uma mesma operação.

As amostras geradas na etapa (3) foram destinadas somente à cromatografia, pela impossibilidade de se coletar volumes maiores e produzir alíquotas para o ensaio YES, nesta ocasião. Vale ressaltar que a coleta de grandes volumes não foi feita para se evitar o estoque em longos períodos e consequente degradação dos componentes alvo.

Os cálculos de recuperação foram realizados conforme a Equação 4 (descrita no capítulo de Revisão Bibliográfica). Assim, para as operações da etapa (1), as amostras destinadas à CLAE e ao YES estão exemplificadas na Figura 19: (a) saída do decantador secundário, (b) permeado da MF, (c) permeado da OI e (d) concentrado da OI. Em contrapartida, os pontos de amostragem das etapas (2) e (3), não contaram com as amostras do concentrado da OI (d). É importante salientar que não foram inseridos, em nenhum momento,

os estrogênios estudados, ou seja, foram avaliados os estrogênios presentes no efluente da ETE.

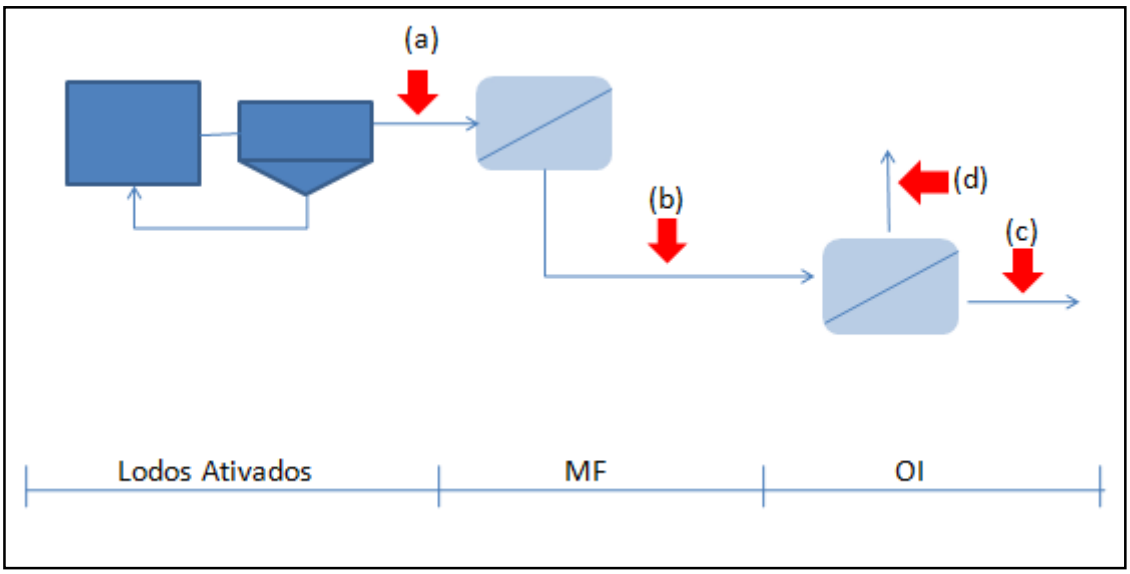


Figura 19. Esquema do PSM, no qual são indicados os pontos de amostragem: (a) saída do decantador secundário, (b) permeado da MF, (c) permeado da OI e (d) concentrado da OI

Com o objetivo de acompanhar a eficiência da membrana, com métodos já amplamente consolidados, realizaram-se análises de condutividade e Abs_{254}, conforme descrito na Tabela 19.

3.7 PROCESSO OXIDATIVO UV/H_2O_2

Os testes com POA, UV/H_2O_2, foram conduzidos concomitantemente ao PSM, contudo, com amostras coletadas em dias diferentes, pela impossibilidade de obtê-las em grandes quantidades. Para estudar este processo, houve a construção de um sistema fechado, tipo uma câmara escura contendo lâmpada de UV de 20 W e com intensidade de 6,8 W m^{-2}, na parte interna da tampa, medida por radiômetro (Delta ohm, HD2012.2). A fim de promover agitação mecânica da solução de esgoto biotratado e do H_2O_2 adicionado, em becher de 600 mL, utilizou-se agitador magnético (lab-disc white, IKA®) e barra magnética. O volume total tratado para todas as condições experimentais investigadas foi 550 mL, sendo 500 mL

destinados à CLAE, ou ao YES, e 50 mL para as análises de COT, Abs_{254} e H_2O_2 residual, após o tempo estabelecido de tratamento. Não foi observada evaporação da amostra.

Logo após o tempo necessário de cada condição investigada, foi adicionada solução de bissulfito de sódio (4 g L^{-1}) para consumo total do H_2O_2 remanescente da reação. Essa técnica foi aplicada para evitar a superestimação dos resultados, interrompendo, assim, as reações de oxidação.

Os experimentos foram divididos em duas etapas:

(1) Variação da dose de UV (24,48, 73,44, 122,4 e 244,8 kJ m^{-2} correspondente a 1, 3, 5 e 10 horas de reação, respectivamente), concentração fixa de H_2O_2 (18,8 mg L^{-1}) em relação 1:1 com o COT, e sem pré-tratamento; e
(2) Planejamento experimental, com pré-tratamento.

O pré-tratamento, com aplicação de membrana de MF (NP010, polietersulfona, Mycrodyn Nadir, 0,05 µm), foi realizado somente na segunda etapa, após a identificação da ineficiência de consumo de H_2O_2, na etapa anterior, a qual apresentou elevada concentração de H_2O_2 residual (será discutido no capítulo de Resultados e Discussão).

A partir dos resultados da etapa (1) optou-se pela realização de planejamento experimental, para o alcance da melhor relação UV:H_2O_2 na remoção de E2, EE2, E3 e atividade estrogênica, com o menor número de experimentos necessários para obtenção de respostas satisfatórias. Assim, o programa utilizado, Design Expert 9.0, foi programado para o tipo fatorial 2^2, com três pontos centrais. Os valores efetivos e codificados, para cada variável, estão relacionados na Tabela 23.

Tabela 23. Valores efetivos e codificados para planejamento experimental.

Parâmetros	Níveis		
Valores codificados	-1	0	+1
H_2O_2 (mg L^{-1})	4	10	16
Dose UV (kJ m^{-2})	24,48	73,44	122,4
Tempo (h)	1	3	5

Assim, a Figura 20 apresenta um esquema do POA empregado neste trabalho, bem como os pontos de análises das amostras: (a) saída do decantador secundário; (b) amostra

tratada pelo POA sem pré-tratamento; (c) permeado da MF; (d) amostra tratada pelo POA com pré-tratamento.

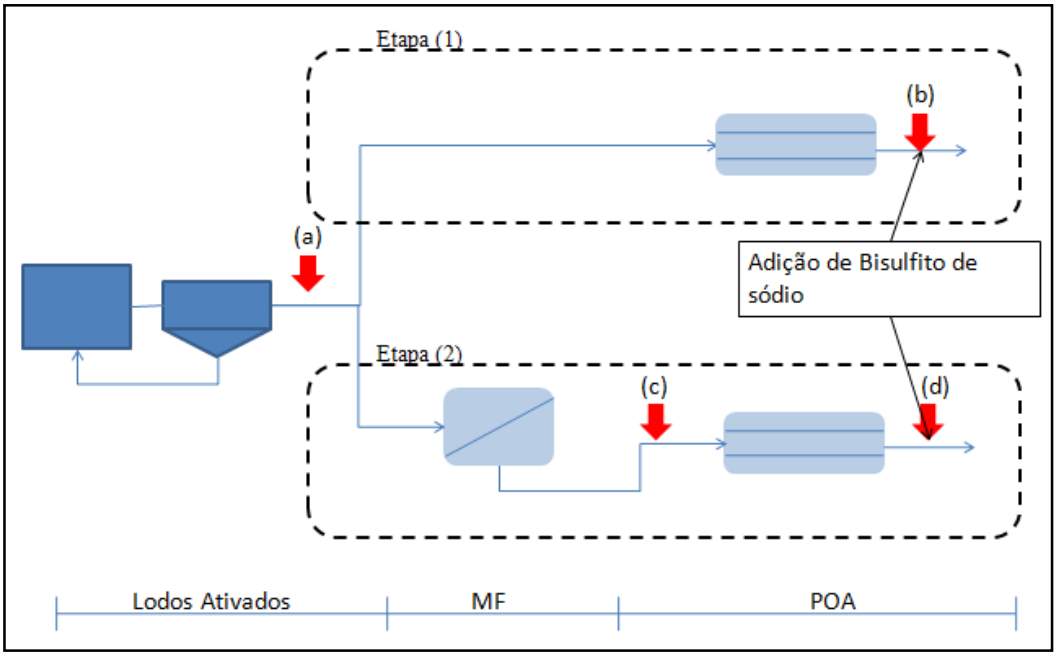


Figura 20. Esquema do POA, nos quais são mostrados os pontos de amostragem: (a) saída do decantador secundário; (b) amostra tratada pelo POA sem pré-tratamento; (c) permeado da MF; (d) amostra tratada pelo POA com pré-tratamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA

Os requisitos para validação da metodologia foram analisados para todos os estrogênios avaliados neste estudo. Os valores de R, R^2, LD e LQ, bem como as equações obtidas a partir das curvas analíticas, estão dispostos na Tabela 24.

Tabela 24. Equação da reta, R, R^2 e LD e LQ para os três estrogênios obtidos em uma mesma corrida cromatográfica.

Estrogens	Equação	T_{ret} (min)	R	R^2	LD (µg L^{-1})	LQ (µg L^{-1})
E2	y = 62600 x - 86000	7,766	0,999	0,998	1,15	3,34
EE2	y = 49300 x + 74000	8,359	0,999	0,997	1,86	3,58
E3	y = 36600 x – 53600	3,912	0,999	0,998	1,00	3,50

Tempo de retenção (T_{ret}); Coeficiente de correlação (R); Coeficiente de determinação (R^2); Limite de detecção (LD); Limite de Quantificação (LQ)

Com base no coeficiente de correlação, R, e o coeficiente de determinação, R^2, pôde-se verificar que as curvas estão dentro dos parâmetros fornecidos pelo INMETRO (2010), ou seja, acima de 0,90, demonstrando ótima linearidade da curva analítica.

No Apêndice I estão disponíveis as curvas de calibração para cada hormônio, bem como as concentrações de cada triplicata utilizadas para o cálculo do LD. O LQ foi obtido a partir da menor concentração da curva analítica.

Apesar de ter analisado somente o EE2, Oliveira (2015) atingiu 2 µg L^{-1} para o LQ, enquanto Lima et al. (2012) chegaram a 2 e 6,5 ng L^{-1} para o LD de E2 e EE2, respectivamente (neste caso já foi considerada a extração de 8 mL e ressuspensão de 2 mL). Desse modo, os LD e LQ, observados na Tabela 24, estão de acordo com o encontrado na literatura.

É importante salientar que a etapa de extração aperfeiçoou a cromatografia no que tange à diminuição de interferentes (pela etapa de clean-up) e pela concentração dos hormônios, permitindo, assim, suas detecções a níveis de ng L^{-1}. Neste caso, o fator de

concentração para todas as amostras deste trabalho foi de 250 vezes com extração de 500 mL de amostra e 2 mL de ressuspensão.

Ademais, a Figura 21 fornece os cromatogramas referentes à segunda injeção, de cada diluição do padrão, contendo os três estrogênios, para construção das curvas analíticas.

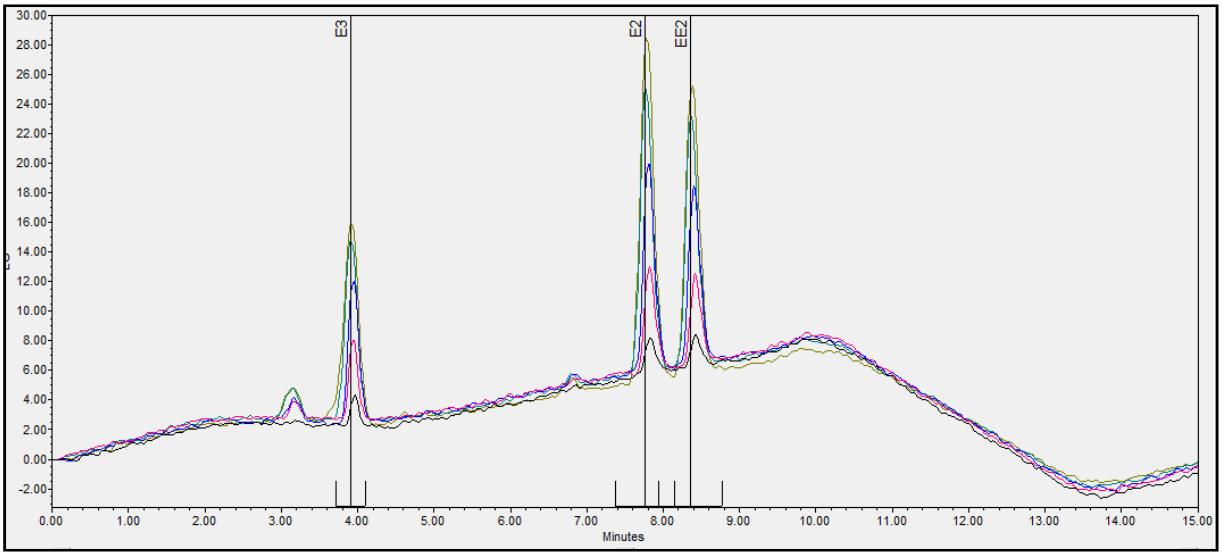


Figura 21. Cromatogramas da curva padrão contendo E2, EE2 e E3 a concentrações de aproximadamente 50, 25, 10, 6, 3 µg L^{-1}.

A dopagem da amostra com o padrão, contendo os três hormônios, foi utilizada para avaliar a recuperação do método (engloba as etapas de filtração, extração, ressuspensão e a análise propriamente dita) e a seletividade. Na Tabela 25 são apresentadas as recuperações (menores, medianas e maiores) atingidas para as concentrações investigadas.

Tabela 25. Recuperações atingidas a partir de seis concentrações diferentes do padrão.

Concentração média	Recuperação (%)		
	E2	EE2	E3
20 ng L^{-1}	80	71	104
50 ng L^{-1}	121	80	85
100 ng L^{-1}	71	68	89
2.5 µg L^{-1}	96	90	113
10 µg L^{-1}	95	93	99
25 µg L^{-1}	95	94	96

Os resultados mostraram-se satisfatórios com porcentagens de recuperação variando de 68 a 121%. Resultados similares foram atingidos com 79-102%, 76-96% e 110% para E2, EE2 e E3, respectivamente (STAFIEJ, PYRZYNSKA e REGAN, 2007; PATROLECCO, ADEMOLLO, *et al.*, 2013). Cabe comentar que Souza (2011), analisando as recuperações de E2 e EE2, em cartucho Strata-X, mas em equipamento CLAE-UV, alcançou percentagens de 10 e 7.53 %, para concentrações em µg L^{-1}, ou seja, valores inferiores aos encontrados nesse trabalho.

Contudo, percebe-se que para concentrações na ordem de ng L^{-1} são atingidas menores percentagens quando comparadas com as de µg L^{-1}. Isso se deve a maiores efeitos da matriz que pode aumentar ou diminuir o sinal obtido pelo detector. Perdas durante o processo de extração também são mais sensíveis quando se trabalha em menores concentrações.

A partir da Tabela 25, pode-se, também, verificar que para menores concentrações, o efeito da matriz aumenta, obtendo-se recuperações acima de 100%. Isso está relacionado a supostos interferentes nesse tipo de amostra. Para diminuir esses efeitos, foram realizadas diluições das amostras obtidas nos testes de PSM e POA.

O efeito matriz, a respeito das concentrações em ng L^{-1}, também foi analisado pelas Figuras 24 e 25. Esta última, por sua vez, apresenta os picos de E3 e E2 deslocados para a direita e esquerda, respectivamente, enquanto o pico de EE2 não é afetado pela matriz. Neste caso, o próprio equipamento de CLAE corrigiu esses efeitos com o deslocamento no tempo de retenção.

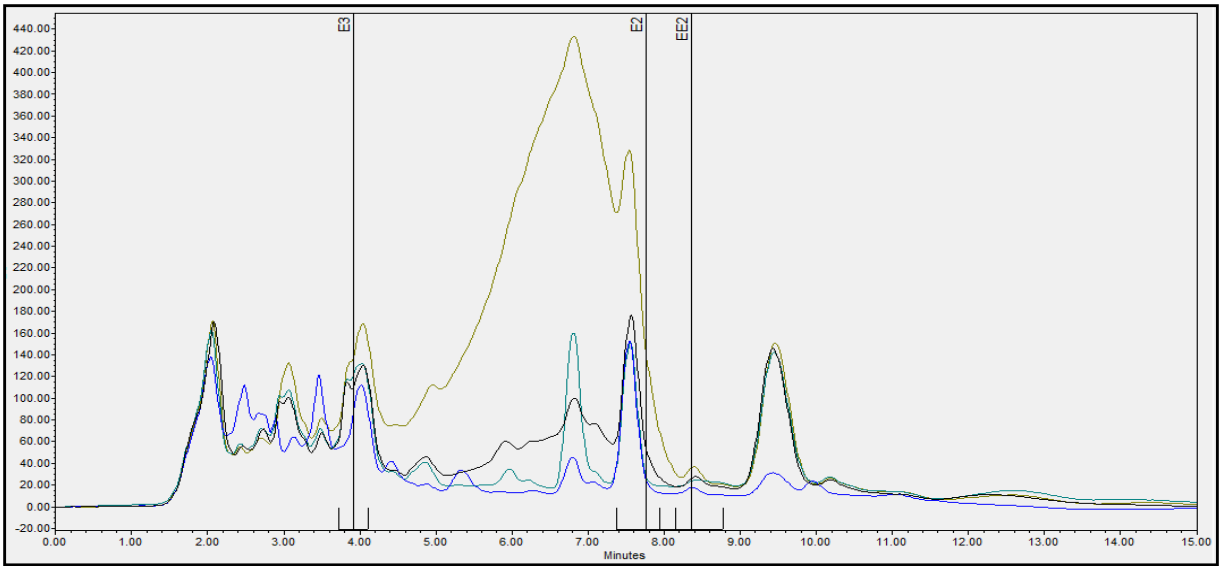


Figura 22. Cromatogramas do teste de recuperação para concentrações 20, 50 e 100 ng L^{-1}.

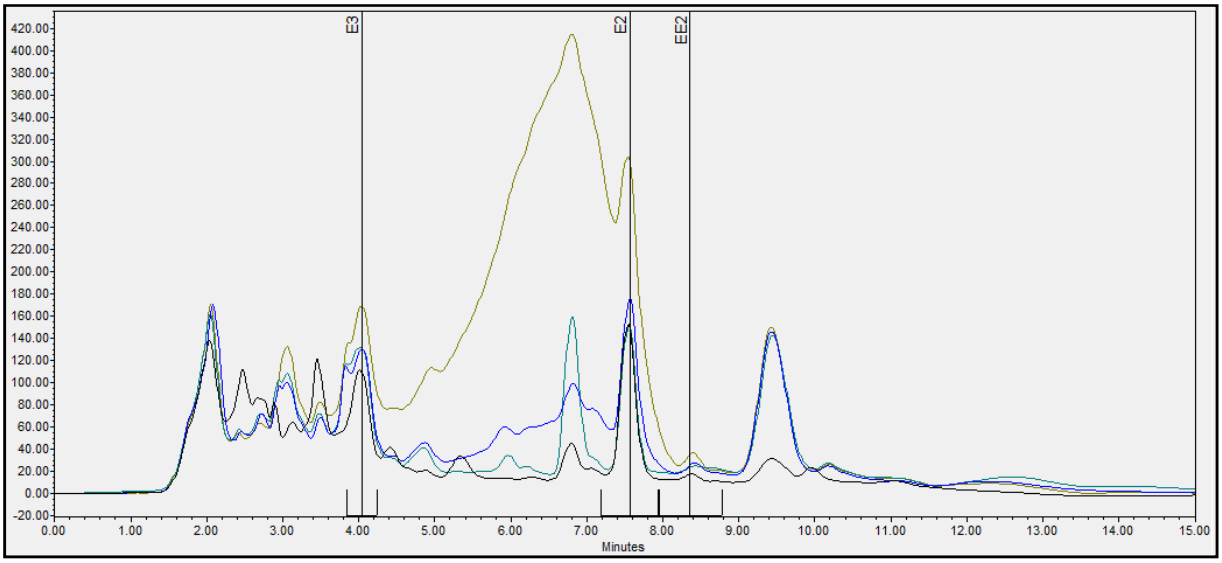


Figura 23. Cromatogramas do teste de recuperação, considerando o efeito matriz, para concentrações de 20, 50, e 100 ng L^{-1}.

Sendo assim, com as devidas otimizações a partir de diluições, onde foi possível diminuir o efeito matriz, Figura 23 (cromatograma em preto), o método se mostrou adequado para ser utilizado como quantificação e detecção de E2, EE2 e E3 em amostras de esgoto sanitário biotratado, bem como para as amostras obtidas após o tratamento de PSM e POA, em escala de bancada.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESGOTO BIOTRATADO DA ETE

Todas as amostras de esgoto biotratado da ETE foram coletadas entre os meses de Junho a Dezembro de 2015, totalizando 9 coletas. Para cada coleta, foram separadas alíquotas (1 L) destinadas à caracterização físico-química do efluente. Parâmetros como DQO, pH, Turbidez, COT, Amônia e Fósforo Total, estão disponíveis na Tabela 26. Além desses, são fornecidas também as concentrações máxima e mínima dos estrogênios E2, EE2 e E3.

Tabela 26. Parâmetros físico-químicos (COT e Abs_{254}) e concentrações de E2, EE2 e E3, referentes a nove coletas de esgoto biotratado de ETE, durante os meses de Junho à Dezembro de 2015.

Parâmetros	Mínimo	Máximo	Média	Número de Amostras	Desvio Padrão
COT (mg L^{-1})	4,1	18,8	9,5	8	3,5
Abs_{254} (cm^{-1})	0,081	0,19	0,13	7	0,04
E2 (ng L^{-1})	ald.	1876,4	238,1	9	364,0
EE2 (ng L^{-1})	ald.	79,3	26,1	9	17,41
E3 (ng L^{-1})	577,9	2210,2	939,5	9	331,2

Abaixo do limite de detecção (ald); 17β-Estradiol (E2); 17α-Etinilestradiol (EE2); Estriol (E3)

Os estrogênios apresentaram concentrações abaixo do LD a 1876,4 e 79,3 ng L^{-1} para o E2 e EE2, respectivamente, e 577,9 a 2210,2 ng L^{-1} para o E3. É importante citar que a grande variação das concentrações de E2 e E3 pode ser responsabilizada pela última coleta, a qual ocorreu no mês de dezembro, em condições climáticas adversas às anteriores. Até o mês de outubro, a cidade do Rio de Janeiro encontrava-se em período seco, contudo, os meses de novembro (não houve coleta por motivos de chuva) e dezembro apresentaram índice pluviométrico mais elevado que todo o ano de 2015.

Apesar dos valores encontrados no mês de dezembro, ou seja desconsiderando os valores desse último mês, a média da concentração de E2 e E3 ficou em torno de 33,38 e 780,73 ng L^{-1}, o que, para o primeiro hormônio, está de acordo com o encontrado por Clara et al. (2005): 30 ng L^{-1}. Esses autores investigaram a presença dos compostos em cinco ETE, localizadas na Áustria, e reportaram concentrações de EE2 e E3 (5 e 275 ng L^{-1},

respectivamente) um pouco abaixo das descritas nesta dissertação, mas com a mesma ordem de grandeza.

Servos et al. (2005) estudaram a presença de E2 em diversas ETE localizadas no Canadá e encontraram em todas as amostras valores entre 0,2 e 14,7 ng L^{-1}. Manickum e John (2014) mostraram que as ETE localizadas na África do Sul apresentam valores médios de E2 e EE2 de 20 e 3 ng L^{-1}, sendo que, o E3 esteve abaixo do LD para todas as amostras. No Brasil (ver Tabela 8), podem ser encontrados os E2 e EE2 em efluente de ETE que empregam Lagoas de Estabilização ou Lodos Ativados, em concentrações abaixo do LD a 4350 e 1200 ng L^{-1}, sendo o sistema de Lodos Ativados o mais eficiente para remoção de estrogênios (SOUZA, 2011; FROEHNER, PICCIONI, *et al.*, 2011; PESSOA, SOUZA, *et al.*, 2014).

4.3 REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS POR OSMOSE INVERSA

Por conseguinte, neste trabalho optou-se pela membrana de OI (BW30) para remoção de E2, EE2 e E3 e atividade estrogênica em efluente de ETE (biotratado). Contudo, antes de ser realizado o processo de OI, foi necessária a utilização de MF (NP010) como pré-tratamento, com objetivo de remover sólidos suspensos e microrganismos e, consequentemente, diminuir problemas de depósitos como *fouling* e *biofouling* na OI.

Dado que a MF foi aplicada somente como pré-tratamento para a OI e considerando que a microfiltração não é capaz de remover micropoluentes (HUANG, CHO, *et al.*, 2011; GARCIA, MORENO, *et al.*, 2013), todos os resultados deste capítulo foram analisados perante o permeado da MF como entrada da OI.

4.3.1 Caracterização da membrana de OI

Inicialmente, a membrana de OI foi testada em relação ao fluxo (J) para cinco pressões diferentes (7, 10, 12 e 15 bar) em tempos de até 60 minutos e utilizando água ultrapura. Além disso, para avaliar a eficiência da membrana perante a rejeição de sal, uma solução salina de 2 g L^{-1} de NaCl foi conduzida à pressão de 20 bar (conforme especificação do fabricante, na qual a BW30 retém 99% de sais a pressões de até 41 bar). Os gráficos de J x tempo obtidos estão disponíveis na Figura 24.

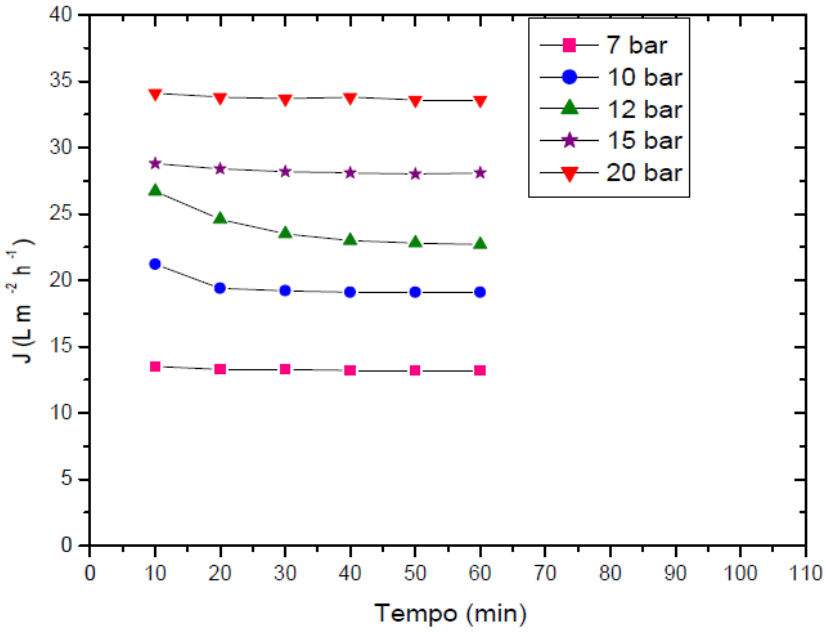


Figura 24. Relação fluxo/tempo para diferentes pressões em água ultrapura (7, 10, 12, 15 bar) e água salobra (20 bar).

A aplicação de 20 bar ao sistema possibilitou uma eficiência de remoção de 98% de NaCl presente na água ultra pura, viabilizando essa condição para os testes seguintes. Heo et al. (2013) atingiram as mesmas percentagens de remoção para BW30 a 20 bar e fluxo variável de 40 a 32 L m^{-2} h^{-1}.

Da mesma maneira, o fluxo a 15 bar (28 L m^{-2} h^{-2}) está em conformidade com o fabricante (máximo de 49 L m^{-2} h^{-2} à pressão de 15,5 bar). A pequena variação, no período inicial de 20 minutos, do J, observada nas pressões de 12 e 10 bar (Figura 24) pode ser explicada pelo processo de compactação da membrana.

Assim, a pressão de 20 bar foi escolhida para os testes em solução sintética e efluente de ETE microfiltrado.

4.3.2 Influência do pH na remoção de estrogênios em solução sintética de água ultrapura

O efeito do pH na remoção dos estrogênios pela membrana de OI, foi investigado, visando assim, à definição do pH adequado para os ensaios de permeação. Para esta etapa foi produzida solução sintética de E2, EE2 e E3 em concentrações (27,27; 29,95 e 765,59 ng L^{-1},

respectivamente) similares às encontradas no esgoto biotratado da ETE. As rejeições obtidas a partir da aplicação da OI em pH 5 e 11, para os três DE, estão apresentadas na Figura 25.

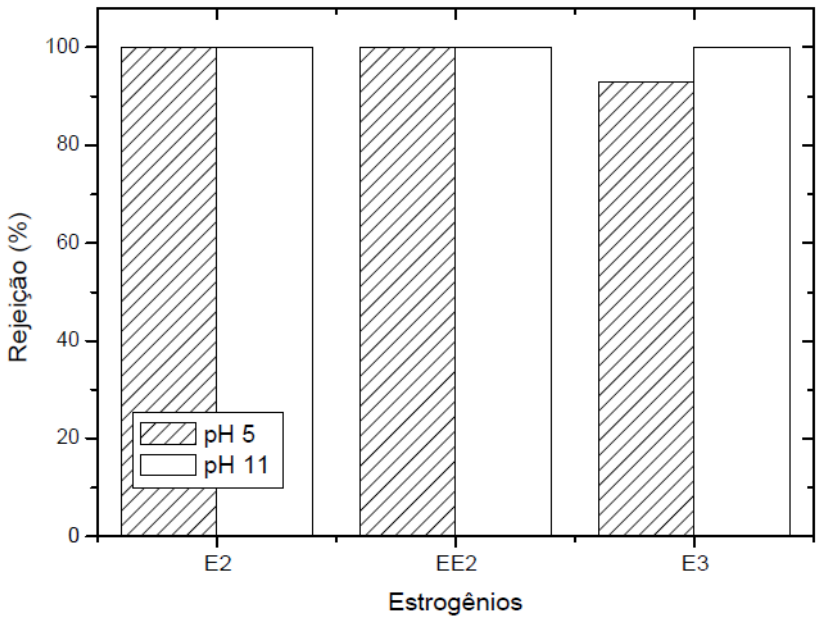


Figura 25. Rejeição de E2, EE2 e E3 em água sintética em pH 5 e 11

Pode-se verificar que o pH não apresentou influência na remoção dos hormônios E2 e EE2. Para ambos, foi atingido 100% de remoção, estando sua concentração abaixo do LD. Para o E3, somente a pH 11 o permeado esteve abaixo do limite de detecção, configurando 100% de remoção. É importante salientar que não foram feitas repetições em nenhum processo.

Kimura et al. (2004) estudaram a remoção de 11 micropoluentes, dentre eles o E2, em água sintética a pH 7, por OI (membrana de poliamida XLE- DowFilmtec) em modo *cross-flow*. Os autores atingiram remoção de 83% de E2 e comentaram que as rejeições obtidas não possuem relação com o log K_{ow} e momento dipolo.

Diversos autores relatam que a melhor eficiência de remoção de estrogênios se dá a pH maior que o pK_a do composto, por motivos de repulsão elétrica com a membrana (CLARA, STRENN, *et al.*, 2004; NGHIEM, MANIS, *et al.*, 2004; SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011; HEO, BOATENG, *et al.*, 2013). Contudo, em pH 5 conseguiu-se atingir valores de remoções superiores a 90% para todos os estrogênios. Essa elevada remoção pode estar relacionada ao tamanho das moléculas, a qual a membrana de OI, densa, consegue remover pelo fenômeno de exclusão por tamanho. Essa observação contraria a posição de

Kimura et al. (2004), que sustenta outros mecanismos de separação envolvidos, principalmente quando é empregada matriz ambiental, como os fenômenos de adsorção e repulsão elétrica.

Para o E3 o aumento do pH de 5 para 11 possibilitou sua remoção completa, ficando abaixo do LD no último caso. Isso pode ser explicado por sua alta solubilidade em água (441 mg L^{-1}) e baixa hidrofobicidade (log K_{ow} < 2,5) o que dificulta a interação com a membrana de poliamida e hidrofóbica, aumentando a rejeição. Pode-se destacar também a repulsão elétrica, pois em pH 11, tanto o hormônio quanto a membrana, estão em sua forma ionizada negativamente.

Em vista dos resultados apresentados na Figura 25 e a sua posterior discussão, foi decidido pela permanência do pH natural da amostra, que variou de 4,1 a 6,0 em todas as coletas conduzidas ao PSM. Com isso, pôde-se evitar gastos desnecessários com soluções de ajuste de pH em amostras de esgoto sanitário biotratado.

As concentrações dos hormônios, referentes às remoções apresentadas na Figura 25, estão descritas na Tabela 27.

Tabela 27. Concentrações dos estrogênios nas amostras de solução sintética antes e após a permeação pela OI (entrada, permeado e concentrado) em pH 5 e 11.

Amostra	**pH**	**E2 (ng L^{-1})**	**EE2 (ng L^{-1})**	**E3 (ng L^{-1})**
Entrada	7	27,27	29,95	765,59
Permeado	5	ald.	ald.	57,78±2,13
	11	ald.	ald.	ald.
Concentrado	5	94,92±0,27	81,57±0,89	2112,85±17,77
	11	73,66±2,84	76,75±1,70	1927,97±17,72

ald. = abaixo do limite de detecção

A partir dos valores expostos na Tabela 27, percebe-se a provável adsorção dos hormônios na membrana. Heo et al. (2013) avaliaram a rejeição de EE2 com membrana BW30 em modo *cross-fow* e pressão de 20 bar, atingindo rejeições de 95%. Os autores atribuem esse resultado à elevada adsorção do estrogênio em membrana de poliamida o que aumentaria a rejeição. Estudos de adsorção provaram que 90% de EE2 adsorvem na camada superficial da membrana, o que está associado a sua natureza hidrofóbica e a presença do grupo metila na estrutura atômica do EE2 (HEO, BOATENG, *et al.*, 2013). A conformação

estrutural do composto permite a sobreposição de orbitais com camada superficial da membrana (HEO, BOATENG, *et al.*, 2013). O mesmo pode ser explicado para o E2 e E3 por também possuírem grupamentos metila em suas conformações.

4.3.3 Influência da recuperação

Diferentes recuperações foram testadas, em membrana de OI, a fim de se avaliar a rejeição dos estrogênios e da atividade estrogênica em efluente de ETE biotratado após a MF. Foram estudadas recuperações de 50, 60 e 70% aplicando-se pressão de 20 bar. Para todos os testes nessa seção o permeado da MF foi considerado como entrada da OI.

As rejeições obtidas a partir dos testes de recuperação para os três hormônios, estão demonstradas na Figura 26.

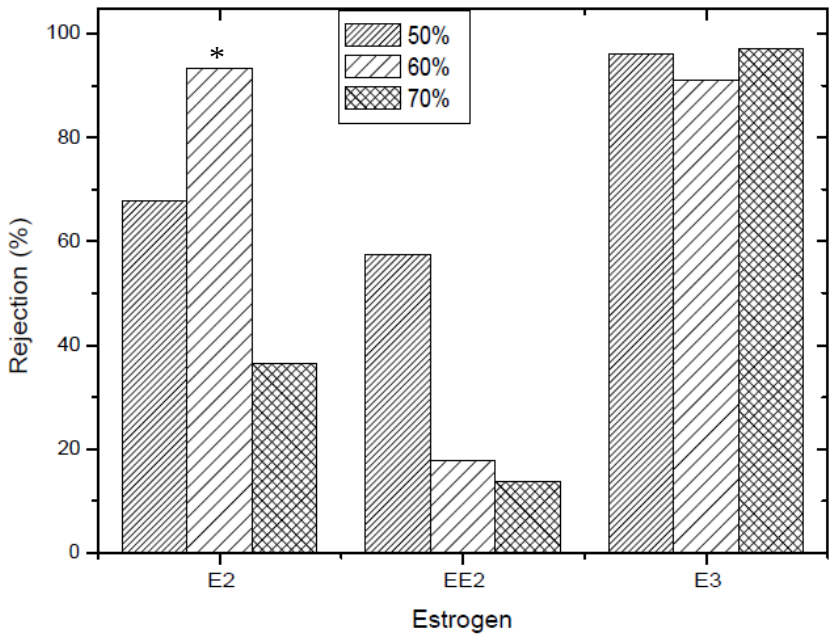


Figura 26. Rejeição de E2, EE2 e E3 pela aplicação de OI em recuperações de 50, 60 e 70%. *Calculado utilizando-se o valor de LQ, pois o mesmo apresenta valor < LQ.

A rejeição de E2 aumenta com a passagem de 50 para 60% de recuperação e diminui, quando se opera a 70%. Entretanto, para o EE2, as rejeições diminuem conforme o aumento da recuperação, com o menor valor em 50% de recuperação. Diferentemente, o E3 apresentou elevadas rejeições para todas as condições testadas (acima de 91%). Esses comportamentos podem ser explicados pelas propriedades físico-químicas dos estrogênios e pelo fenômeno de

separação promovido pela membrana de OI, fabricada a partir de material hidrofóbico de poliamida.

A massa molar é documentada por exercer grande papel na rejeição dos micropoluentes por membranas densas, sendo até mais importante que a rejeição salina para previsão de retenção de estrogênios (YANGALI-QUINTANILLAA, MAENG, *et al.*, 2010; CARTAGENA, KADDOURI, *et al.*, 2013; LIU, ZHANG, *et al.*, 2014; RODRIGUEZ-MOZAZ, RICART, *et al.*, 2015).

Contudo, a rejeição de compostos maiores que os espaços intermoleculares das membranas densas, não ocorre em alguns casos. Nesse sentido, o fenômeno de exclusão por tamanho não é o principal mecanismo de separação quando se emprega membranas densas e matrizes ambientais, que possuem uma grande variedade de componentes (KIMURA, TOSHIMA, *et al.*, 2004; SADMANI, ANDREWS e BAGLEY, 2014).

Um mecanismo que pode estar envolvido é a afinidade do hormônio com a superfície da membrana. Neste caso o log K_{ow} do E2 e EE2 (>2.5) indica a forte afinidade com a membrana de poliamida o que facilitaria a passagem através da BW30 por adsorção, seguida pelos mecanismos de difusão e dessorção para o permeado (SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011). Ao contrário do observado para E2 e EE2, o E3 apresenta log K_{ow} menor que 2,5, indicando menor afinidade com a membrana e, consequentemente, maior remoção.

O leve decaimento do fluxo, em 70% de recuperação (Apêndice III), é também um indicativo de adsorção competitiva entre compostos orgânicos e a água, nos interstícios moleculares da membrana (WILLIAMS, HESTEKI, *et al.*, 1999). Comerton et al. (2007) concluíram que a adsorção em membranas aumenta conforme a diminuição da solubilidade dos DE em água. Heo et al. (2013) confirmam a adsorção de 90% de EE2 em membrana comercial BW30.

O elevado valor de pK_a dos três estrogênios (10,7, 10,4 e 10,4 para E2, EE2 e E2, respectivamente) propõe menor rejeição para amostras cujo pH esteja abaixo que o pK_a, diminuindo a repulsão eletrostática entre o composto e a superfície da membrana (SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011).

Outro tópico que deve ser considerado, para o entendimento dos efeitos observados na Figura 26, é a configuração do sistema do processo de separação. Os módulos de *cross-flow* têm como principal vantagem a diminuição de deposição de materiais na superfície da membrana, melhorando, assim, a permeabilidade e reduzindo o *fouling*. Contudo, os sistemas *dead-end* são conhecidos pelo decaimento do fluxo e aumento mais expressivo de *fouling*. Assim, esse sistema poderia aumentar o contato dos compostos (presentes no seio da solução)

com a superfície da membrana, facilitando a adsorção e consequente difusão e sorção no permeado de componentes afins com o material de poliamida.

Nghiem et al. (2004) compararam a remoção de estrona pelos dois diferentes tipos de filtração e notaram que, enquanto a concentração do permeado aumentava no *dead-end*, a retenção de estrona no *cross-flow* continuava a mesma. Observaram também, um aumento da concentração de estrona na superfície da membrana no *dead-end* (maior que no *cross-flow*), o que pode favorecer o transporte de aromáticos pela superfície da membrana.

O longo período de ensaio para atingir 70% de recuperação também pode ter comprometido a rejeição de estrogênios, pois permitiu contato prolongado dos compostos com a superfície da membrana. Kimura et al. (2004) constataram a mesma tendência estudando a remoção de E2 para diferentes membranas de OI. Os autores concluíram que estudos realizados previamente, em menores tempos de filtração, podem subestimar os resultados. Posteriormente, comprovaram que em 24 horas, aplicando sistema *cross-flow*, observaram menores rejeições para E2 (29 e 83%) e outros DE. Nghiem et al. (2004) advertem que os valores obtidos no sistema *dead-end* subestimam a capacidade de retenção de E1 em longos períodos de operação.

É imprescindível notar, também, a grande diferença entre os resultados alcançados nesta etapa e os obtidos com solução sintética (a última forneceu concentrações de estrogênios no permeado abaixo do LD). Essa diferença pode ser associada à presença de materiais que favorecem o contato dos estrogênios com a membrana, ou mesmo, a competição entre os espaços intermoleculares da membrana, formando uma nova superfície, mais hidrofóbica. A presença de componentes diversos em uma matriz de esgoto sanitário biotratado pode favorecer as interações soluto-soluto, o que dificulta a previsão de remoção de micropoluentes (SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011). Os materiais que ficam retidos podem modificar a superfície da membrana e favorecer a passagem de orgânicos (SCHÄFER, AKANYETI e SEMIÃO, 2011).

As concentrações obtidas nos testes que avaliaram as recuperações, estão disponíveis na Tabela 28. Vale destacar que somente o E2 em recuperação de 60% ficou abaixo do LQ no permeado da OI, mas acima do LD. Neste caso, foi considerado o valor de LQ (3,34 ng L^{-1}), para o cálculo de rejeição. Apesar desse único resultado, todas as condições apresentaram concentrações a níveis de traço (entre 15.17 e 93.11 ng L^{-1}) dos estrogênios. Isso permite a conclusão de que os diversos fenômenos discutidos anteriormente contribuem para a presença de orgânicos no permeado (no Apêndice II foi selecionado um cromatograma do permeado, 70% de recuperação, mostrando os picos relacionados aos estrogênios e a outros orgânicos).

Tabela 28. Concentração das amostras de esgoto biotratado após os PSM (Permeado da MF, permeado da OI e Concentrado da OI).

Amostra		E2 (ng L^{-1})	EE2 (ng L^{-1})	E3 (ng L^{-1})
MF	**Entrada das Amostras**			
Permeado	*	49,26±9,45	35,59±4,45	1044,59±20,39
	**	31,19±8,05	30,08±3,08	842,60±1,26
OI	**Recuperação (%)**			
Permeado	50	15,93±4,25	15,17±7,28	40,92±0,51
	60	< LQ	29,29±14,26	93,11±2,24
	70	19,82±2,68	25,95±2,08	25,35±1,57
Concentrado	50	100,09±11,65	62,39±12,03	128,55±12,05
	60	102,38±45,96	60,55±31,31	1809,10±38,55
	70	23,41±1,43	41,07±2,16	2287,02±60,68

*Alimentação da OI para as recuperações de 50 e 60 %
**Alimentação da OI para a recuperação de 70%
Limite de Quantificação (LQ)

As concentrações de E2 encontradas no permeado da OI (Tabela 28) podem contribuir de maneira efetiva na atividade estrogênica dessas amostras. De acordo com Silva (2015), o LD do ensaio YES é de 10,13 ± 3,65 ng L^{-1} de Eq-E. Nesse sentido, com o objetivo de não somente verificar a remoção dos estrogênios alvo, como também avaliar a remoção de seus efeitos e de outros DE, foram realizadas análises de atividade estrogênica.

Assim, foram realizados ensaios *in vitro* YES, nas amostras de permeado da MF e da OI, bem como no concentrado da OI, para as recuperações de 50, 60 e 70%. É importante salientar que a mesma amostra de permeado da MF foi aproveitada para as seguintes condições de recuperação da OI: 50 e 60%. A condição de recuperação a 70%, na OI, foi administrada com amostra coletada em dia distinto.

As curvas dose-resposta para as recuperações de 50, 60 e 70%, estão disponíveis nas Figuras 27, 28 e 29, respectivamente.

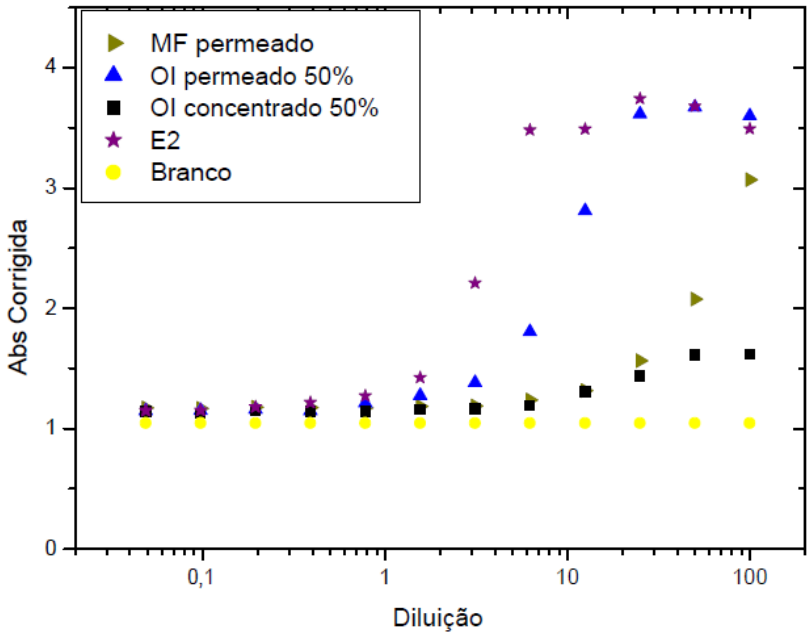


Figura 27. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 50%.

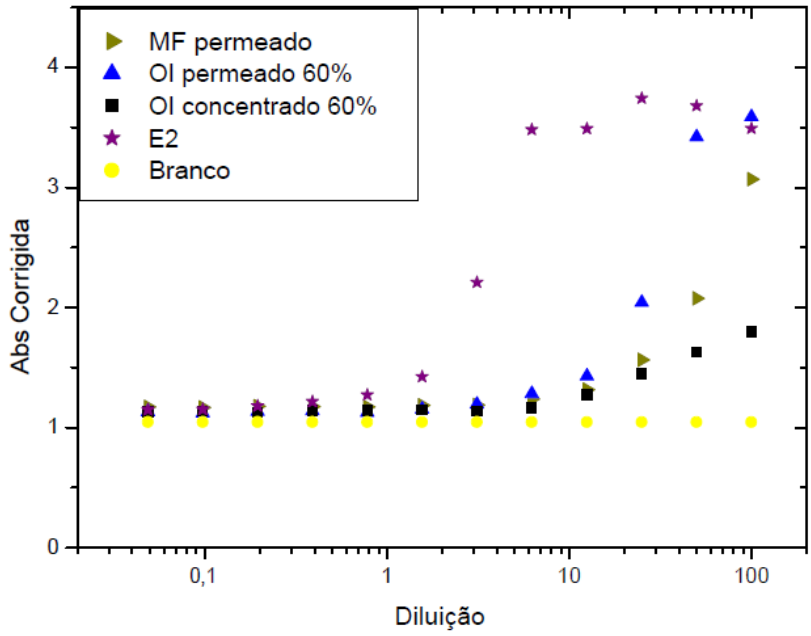


Figura 28. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 60%.

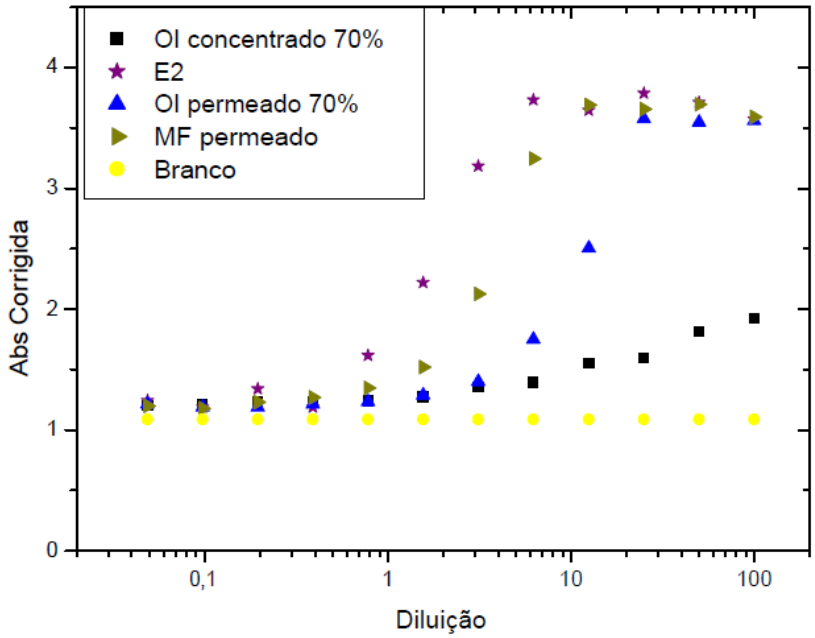


Figura 29. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 70%.

Pôde-se perceber que para todas as condições o permeado da OI apresenta atividade estrogênica maior que o concentrado. Essa observação pode estar relacionada à adsorção de DE em membranas poliméricas (resultado em sua dessorção para o permeado da OI), pois, para a obtenção de amostras para o ensaio YES, as membranas foram previamente utilizadas para a geração de amostras direcionadas à cromatografia (como explicado no capítulo de Materiais e Métodos).

Verificou-se, também, que não houve diferenças entre as curvas dose-resposta das amostras de efluente de ETE e do permeado da MF, comprovando a ineficiência da membrana na remoção de micropoluentes e, consequentemente, da atividade estrogênica (fotografia da microplaca no Apêndice III).

A Tabela 29 fornece os resultados de Eq-E calculados a partir das curvas dose-resposta das amostras obtidas pelas recuperações de 50, 60 e 70%. As fotografias das microplacas, referentes a esses testes, são fornecidas no Anexo IV.

Tabela 29. Resultados de Eq-E para as amostras de permeado da MF e OI e concentrado da OI para recuperações de 50, 60 e 70%.

	Permeado MF			**Permeado OI**			**Concentrado OI**		
Recuperação (%)	50	60	70	50	60	70	50	60	70
Eq-E (ng L^{-1})	0,33	0,33	2,74	2,37	0,40	0,91	0,32	0,29	0,19

4.3.4 Influência do volume de permeação

Com o objetivo de estudar as variáveis que poderiam causar a passagem de estrogênios para o permeado da OI, o que aumentaria a atividade estrogênica, o volume de filtração foi objeto de estudo em recuperação de 70% (escolhida com o intuito de otimizar as condições operacionais) .

Nghiem et al. (2004) e Kimura et al. (2004) sustentam que o tempo de filtração contribui para a adsorção dos estrogênios em membranas poliméricas, diminuindo a eficiência de remoção. Nesse sentido, foram realizados testes que utilizavam uma quantidade mínima de volume de filtração (volume de permeado fixo em 600 mL), pois para os testes de cromatografia e de YES era necessária uma quantidade de 500 mL. Sendo assim, nesta etapa, não foi possível a análise do concentrado da OI, somente dos permeados da MF e OI.

A partir dos testes realizados, atingiram-se maiores rejeições para os três estrogênios, em comparação as respostas da recuperação de 70% em volumes maiores: 70, 33 e 95% de rejeição para E2, EE2 e E3, com concentrações no permeado da OI de 31.99 ± 9.22, 33.89 ± 8.94 e 55.00 ± 6.76 ng L^{-1}, respectivamente. Esses resultados confirmam o que é apresentado por Nghiem et al. (2004) e Kimura et al. (2004).

Apesar das maiores rejeições, empregando-se volumes menores, a presença dos estrogênios, no permeado da OI, em concentrações traço, ainda pode favorecer a atividade estrogênica. Isso pode ser visualizado e confirmado na Figura 30, na qual, mesmo apresentando uma melhora na remoção de DE, ainda é positiva para a atividade estrogênica nas amostras do permeado da OI (0.10 ng L^{-1} de Eq-E). O Apêndice III fornece a microplaca de 96 poços do ensaio YES referente a este teste.

Diante destes resultados, foi decidido avaliar, pelo ensaio YES, duas membranas, uma que já fora utilizada e outra nova, com o objetivo de verificar possíveis contaminações em todo o processo de filtração e posterior preparação da amostra.

Corroborando com o que já foi explicado neste capítulo, os compostos orgânicos adsorvem por afinidade em membranas poliméricas até a sua saturação, sendo posteriormente dessorvidos para a corrente de permeado. Isso pode ser confirmado, também, pela Figura 31, a qual apresenta elevada atividade estrogênica para o permeado de água ultrapura em membrana reutilizada (essa membrana foi empregada anteriormente para as análises cromatográficas e de atividade estrogênica para a recuperação de 70% a volumes menores).

A validação, de todos os resultados obtidos, é confirmada pela isenção de atividade estrogênica no permeado de água ultrapura em membrana nova (Figura 31).

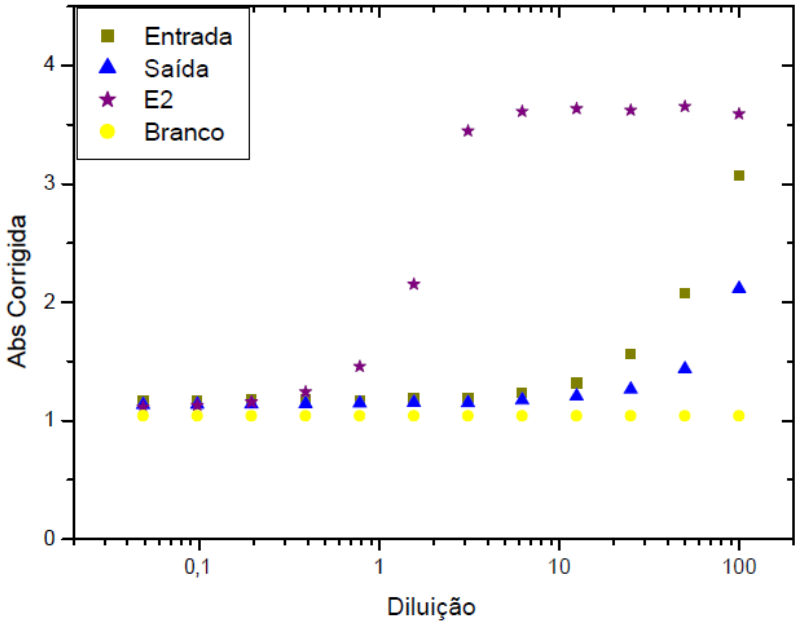


Figura 30. Ensaio YES referente à amostra utilizada na OI com recuperação de 70% a volumes menores.

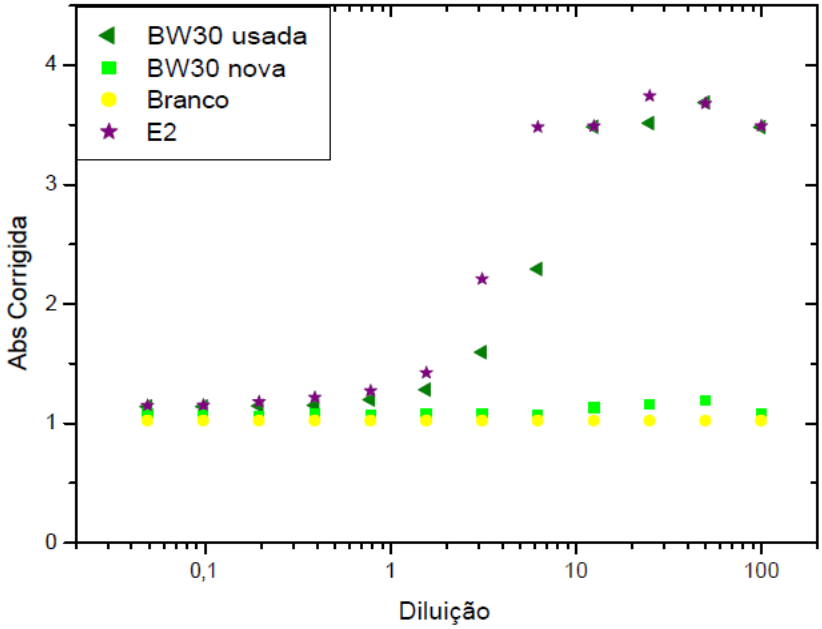


Figura 31. Ensaio YES para diferenciação de membrana de OI nova e usada.

4.3.5 Influência da Pressão de operação

A variação da pressão foi estudada a fim de se obter menores concentrações de estrogênios no permeado da OI, reduzindo assim os efeitos a eles atrelados. Neste caso, trabalhou-se com pressão de 10 bar em recuperação de 70% com volumes menores (permeação de 600 mL), sendo avaliados, somente, os permeados da MF e OI. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 30.

Tabela 30. Concentração de E2, EE2 e E3 nos permeados da MF e OI, em volumes menores, bem como as rejeições atingidas.

	E2	EE2	E3
Permeado MF (ng L^{-1})	1275,25±23,77	< LD	2190,87±27,18
Permeado OI (ng L^{-1})	20,70±6,17	< LD	194,99±2,06
Rejeição (%)	98	-	91

Limite de Detecção (LD)

Para a análise dos resultados obtidos nesta etapa, e comparação com os testes anteriores, devem-se levar em consideração os períodos distintos de coleta do efluente na ETE: as amostras dos testes de recuperação (item 4.3.3) e volume (item 4.3.4) foram obtidas em tempos de seca, enquanto os de pressão, em estação chuvosa. Assim, foram encontradas concentrações bem diferentes para os três estrogênios (ver Tabela 28) nesses dois períodos.

Não foi possível avaliar o EE2, pois estava abaixo do LD do método, não estando, portanto, presente nas amostras do efluente da ETE e do permeado da MF e OI. Foram atingidas rejeições de 98 e 91% de E2 e E3, respectivamente. Associado a esse elevado valor de rejeição, pode-se considerar que o aumento da concentração de E2 e E3, na entrada da OI, não afetou a eficiência da membrana, a qual manteve o permeado com as mesmas características das outras condições. Ou seja, mesmo que a entrada da OI apresente concentrações médias maiores que as anteriores, as concentrações no permeado da OI mantiveram-se quantificáveis a níveis de geração de atividade estrogênica levando em consideração o LD do ensaio YES igual a 10,13 ng L^{-1} (20,70 e 194,99 ng L^{-1} para o E2 e E3, respectivamente).

Diante disso, trabalhar em pressões menores (o que poderia evitar a passagem de orgânicos) não afetou a presença de estrogênios no permeado da OI. Isso confirma a

existência do fenômeno de adsorção de orgânicos, com log K_{ow} maiores que 2,5, em membranas poliméricas hidrofóbicas.

Kimura et al. (2003) compararam a rejeição de diversos micropoluentes em membrana de OI empregando concentrações de ordens de grandeza diferentes, µg L^{-1} e ng L^{-1}. Os resultados de rejeição alcançados foram melhores para os iniciais de concentrações elevadas. Os autores explicam que os experimentos conduzidos em condições de concentração inicial diferentes podem gerar resultados distintos, pois o transporte de micropoluentes através da membrana pode ser regido pela difusão, que é altamente dependente da concentração.

Assim, neste caso, seria necessária uma nova coleta, em período chuvoso, para comparar e analisar se a diferença de pressão afeta na adsorção de micropoluentes em membranas poliméricas de OI, para efluentes de ETE. Este estudo não foi possível ser realizado em virtude da dificuldade de se adquirir as amostras na ETE, ficando, portanto, como sugestão para trabalhos futuros. Pelo mesmo motivo, o teste de atividade estrogênica não foi conduzido, mas pode-se prever que o ensaio YES forneceria respostas positivas à atividade estrogênica, pois 20,70 ng L^{-1} de E2 foram achados no permeado da OI e, segundo Silva (2015), o LD do ensaio YES atinge concentrações de até 10,13 ng L^{-1}.

4.3.6 Rejeição de Aromáticos e Condutividade

Como controles de operação, para todas as amostras analisadas na CLAE e no YES, foram medidas a condutividade e a Abs_{254}. Na Figura 32, estão apresentadas as rejeições obtidas para os testes de recuperação de 50, 60 e 70%, bem como as referentes às amostras de volumes menores a 20 bar (70% de recuperação = 70*) e 10 bar (70% de recuperação = 70*).

Apesar da menor rejeição medida pela Abs_{254} na recuperação de 70%*, pode-se concluir que houve uma tendência na remoção de aromáticos, variando de 75 a 89%. A condutividade, por sua vez, demonstra a elevada eficiência deste tipo de membrana (BW30) na remoção de sais, comprovando que as membranas estavam em perfeito estado para serem analisadas perante a remoção de hormônios e de atividade estrogênica.

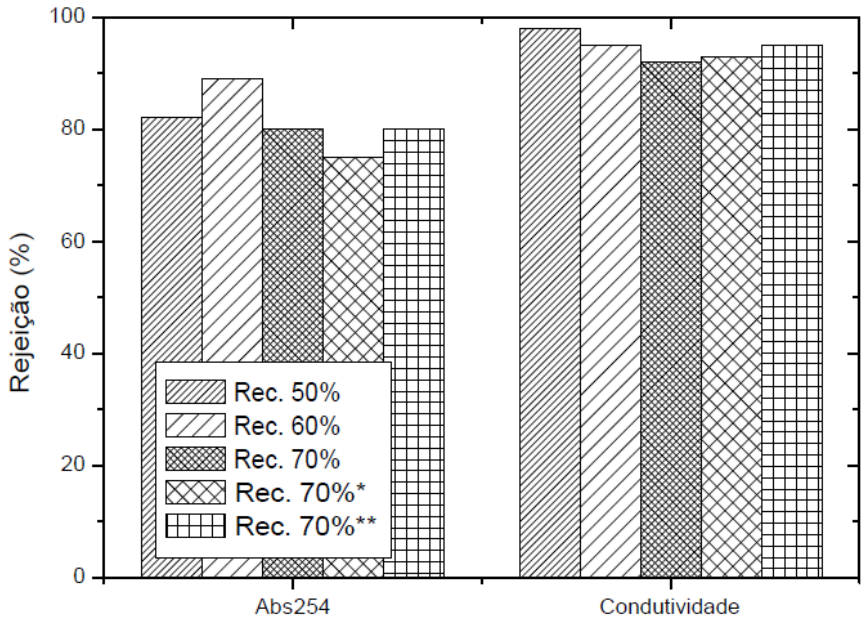


Figura 32. Rejeição em termos de Absorbância (254 nm) e condutividade para amostra de esgoto biotratado por processo de OI com recuperações de 50, 60 e 70%, bem como as amostras obtidas com volumes menores de permeação em 20 e 10 bar para recuperações de 70% (70%* 70%, respectivamente).**

4.4 REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS POR UV/H2O2

A aplicação de luz UV, em escala de bancada, com adição de H_2O_2, foi realizada para degradação de E2, EE2 e E3, bem como a remoção de atividade estrogênica, presentes em efluente de ETE. Para isso, foram realizadas duas etapas: na primeira, foram conduzidos ensaios variando a dose de UV e na segunda, foi investigada a melhor condição de UV/H_2O_2 após o tratamento por MF, pela aplicação de planejamento experimental. É importante ressaltar que as etapas foram realizadas com efluentes coletados em diferentes datas.

Sendo assim, na Tabela 31, são apresentados os resultados das concentrações obtidas para E2, EE2 e E3, bem como o Eq-E fornecido através do ensaio YES. Foram controlados, também, os valores de H_2O_2 residual ($H_2O_{2residual}$) e Abs_{254}.

Tabela 31. Concentração dos estrogênios após diferentes doses de UV em concentração definida de H_2O_2 (18,8 mg L^{-1}).

Dose UV (kJ m^{-2})	Abs_{254}	$H_2O_{2residual}$ (mg L^{-1})	E2 (ng L^{-1})	EE2 (ng L^{-1})	E3 (ng L^{-1})	Eq-E (ng L^{-1-})
0	0,11	0	< LD	79,33 ± 4,07	1133,47 ± 0,68	0,07
24,48	0,10	19	< LD	27,01 ± 0,44	1107,31 ± 13,28	0,05
73,44	0,09	17	< LD	23,92 ± 1,17	1065,63 ± 24,93	0,06
122,4	0,08	15	< LD	20,77 ± 1,84	1026,80 ± 8,23	0,01
244,8	0,07	7	< LD	18,77 ± 1,36	761,14 ± 8,75	0,16

Limite de Detecção (LD)

Na amostra de efluente da ETE e nas geradas após o tratamento com POA, não foram encontrados traços de E2. Entretanto, concentrações de EE2 e E3 podem ter sido expressivas, juntamente com outros DE, na geração de atividade estrogênica, mesmo que mínima, em todas as condições operadas. Nestes testes a dosagem de H_2O_2 foi baseada na relação direta 1:1, H_2O_2:COT.

O menor valor de Eq-E (0,01 ng L^{-1}) foi atingido na condição de 122,4 kJ m^{-2} de dose de UV. Contudo, quando se aplicou doses de UV a 244,8 kJ m^{-2}, alcançaram-se os maiores valores de remoção de EE2 (76%) e E3 (33%) em detrimento da remoção da estrogenicidade da amostra, a qual se mostrou ser a mais estrogênica de todas as condições testadas, inclusive considerando a amostra inicial. Essa observação pode estar associada a produtos de degradação do processo oxidativo, que podem ser mais estrogênicos que os próprios compostos iniciais (KIM, YAMADA e TSUNO, 2004; BILA, MONTALVÃO, *et al.*, 2007; PEREIRA, POSTIGO, *et al.*, 2011).

As eficiências de remoção de EE2, E3 e Eq-E, para as variações das doses de UV são mostradas na Figura 33 e as curvas dose-resposta, obtidas no ensaio YES, estão descritas na Figura 34.

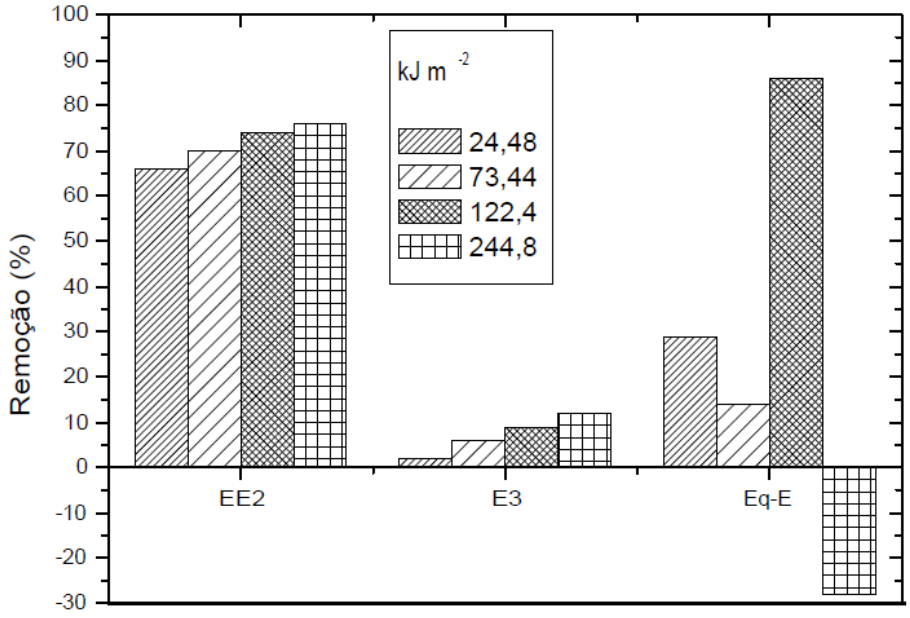


Figura 33. Remoção de EE2, E3 e Eq-E após diferentes doses de UV em concentração definida de H_2O_2 (18.8 mg L^{-1}).

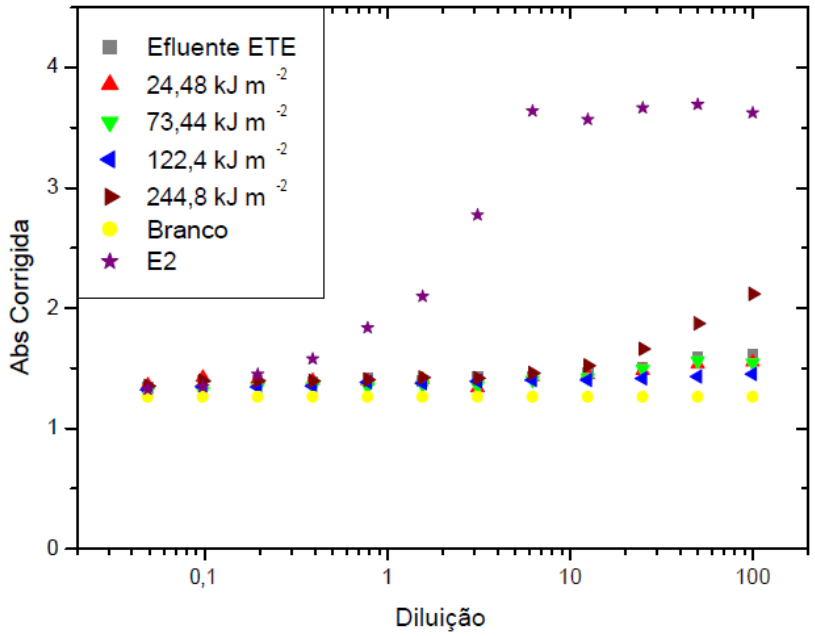


Figura 34. Curvas dose-resposta para amostras de Efluente da ETE e após a aplicação de UV/H_2O_2 para os tempos de 1, 5, 3 e 10 horas, referentes às doses de UV de 24,48, 73,44, 122,4, 244,8 kJ m^{-2}.

Outro fator que deve ser analisado é a permanência do peróxido de hidrogênio na solução para todas as condições testadas (Tabela 31). Percebeu-se, então, que seria necessária uma etapa de pré-tratamento do efluente da ETE, que permitisse a maior penetração de luz UV, no seio da reação e, consequentemente, melhorar a remoção dos estrogênios e de atividade estrogênica.

É de conhecimento que a presença de sólidos suspensos diminui a incidência de luz UV em soluções aquosas, diminuindo, assim, a eficiência do processo UV/H_2O_2 (BELGIORNO, RIZZO, *et al.*, 2007; HAI, NGUYEN, *et al.*, 2014).

Diante do exposto, foi realizado um pré-tratamento com membrana de MF e o permeado foi, então, tratado por UV/H_2O_2. Esta etapa também teve como finalidade a obtenção da melhor relação UV/H_2O_2, proporcionado por planejamento experimental, do tipo fatorial 2^2 com três pontos centrais. A escolha de um método, que forneceria menores quantidades de experimentos, foi feita pela dificuldade de aquisição de elevados volumes de efluentes na ETE.

As faixas de operação das variáveis, do planejamento experimental, foram escolhidas a partir dos resultados obtidos nos processos anteriores (antes da aplicação do pré-tratamento). Nesse sentido, as concentrações de H_2O_2 variaram de 4 a 16 mg L^{-1} e as doses de UV de 24,48 a 122,4 kJ m^{-2}. Na Tabela 32 são dadas as respostas do planejamento experimental.

Tabela 32. Planejamento experimental com os valores codificados e concentração dos estrogênios, TOC, Abs_{254} e H_2O_2 residual após UV/H_2O_2.

Exp.	H_2O_2	Dose UV	E2 (ng L^{-1})	EE2 (ng L^{-1})	E3 (ng L^{-1})	Eq-E (ng L^{-1})	COT (mg L^{-1})	Abs_{254}	H_2O_{2res} (mg L^{-1})
-	-	-	24,3 ± 28,0	77,6 ± 45,6	891,4 ± 8,2	2,00	9,8	0,13	-
1	-1	-1	< LQ	31,0 ± 16,6	1067,8 ± 3,6	0,06	10,3	0,13	4
2	+1	-1	<LQ	23,7 ± 3,7	799,4 ± 9,7	8,49	10,4	0,13	15
3	-1	+1	< LD	< LD	89,1 ± 1,5	1,07	10,6	0,11	0
4	+1	+1	23,5 ± 4,2	32,4 ± 12,3	800,6 ± 4,6	0,92	9,5	0,07	4
5	0	0	< LQ	24,9 ± 5,4	545,0 ± 4,2	0,22	10,5	0,10	10
6	0	0	< LQ	22,0 ± 5,0	580,0 ± 1,7	0,00	10,5	0,11	10
7	0	0	< LQ	20,0 ± 3,3	625,0 ± 4,6	0,03	10,5	0,11	10

Experimento (Exp.); Limite de Detecção (LD.); Limite de Quantificação (LQ)

Para o E2, a única condição que não se mostrou eficiente (considerando o erro), foi a que empregava os maiores níveis de UV e H_2O_2. Isso pode ser explicado pelas reações secundárias, e competitivas, promovidas pelo excesso de H_2O_2, que captura ·OH e inibe a eficiência de degradação (SHU, BOLTON, *et al.*, 2013; JAMES, GERMAIN e JUDD, 2014). Nesta mesma condição, a concentração de EE2, E3 e Eq-E continuou alta.

A intensidade da radiação UV foi uma importante variável nos ensaios para remoção de hormônios por POA. Maiores remoções foram alcançadas na condição que utilizou a menor concentração de peróxido de hidrogênio e a maior dose de UV (-1 e +1), com valores de E2 e EE2 abaixo do LD e a melhor remoção de E3 (90%). Contudo, nesta mesma condição não foi possível reduzir significativamente os valores de COT, Abs_{254} e Eq-E, Tal fato pode estar diretamente ligado a formação de subprodutos pelas reações de oxidação incompletas, como já explicadas anteriormente. Entretanto, esta foi a única condição experimental que consumiu todo o peróxido de hidrogênio.

James et al. (2014) avaliaram a degradação de E2 e EE2 por UV/H_2O_2 em planta-piloto, na qual empregava, no permeado da MF, 6,85 kJ m^{-2} e 3 mg L^{-1} de H_2O_2, atingindo 99% de eliminação dos estrogênios. Cabe citar que, no trabalho conduzido pelos autores, uma quantidade fixa de hormônios (200 ng L^{-1}) foi inserida nas amostras iniciais. Diferentemente, nesse trabalho de dissertação, avaliou-se a remoção desses DE sem nenhuma inserção de padrões.

Kim, Yamashita e Tanaka (2009) reportaram que, devido à baixa concentração de certos micropoluentes, presentes em amostras de efluente de ETE (após filtração em areia), a eficiência de remoção é baixa (67-69%). Para componentes, cuja concentração foi acrescentada em 1000 vezes, no entanto, as rejeições atingiram percentagens maiores que 90%. Esse aspecto também é comentado por Chen e Hu (2009), onde os autores concluíram que o aumento da taxa de degradação de micropoluentes depende da concentração inicial, bem como dos sólidos suspensos. Ou seja, quanto menor é a concentração do micropoluente, maior é a dificuldade para removê-los.

Souza (2011) estudando a remoção de E2 e EE2 por sistema em batelada de UV/H_2O_2 (189 kJ m^{-2}/ 485 mg L^{-1}) atingiu remoções de, somente, 52,6 e 88,7 %, respectivamente, para concentrações iniciais de 2 mg L^{-1} e pH 3. Comparativamente, o processo empregado neste trabalho de dissertação foi mais eficiente, com remoções abaixo do LQ (menor, em 1000 vezes, que o trabalho do autor referenciado) para o E2 e EE2, empregando-se 122,4 kJ m^{-2} de dose de UV e 4 mg L^{-1} de H_2O_2. Vale destacar que o autor não deixou claro a qual amostra esses resultados estavam relacionados, contudo, foram apresentados amostras de efluentes de ETE e água sintética.

A melhor condição de remoção de estrogenicidade foi uma das triplicatas do ponto central, demonstrando atividade. Entretanto, esse resultado não foi repetitivo, pois as duas outras amostras forneceram 0,03 e 0,22 ng L^{-1} de Eq-E. Essa variação para as mesmas condições não permitiu o posterior estudo estatístico, devido à incongruência das respostas obtidas no ensaio biológico.

Rosenfeldt et al. (2007) estudaram a relação de degradação de E2 e EE2 com a remoção de atividade estrogênica, pelo ensaio YES, em água sintética e natural, utilizando UV e UV/H_2O_2. Os autores concluem que a remoção de atividade estrogênica em águas naturais não possui a mesma efetividade quando em água sintética (ultrapura). Os mesmos responsabilizaram a presença de matéria orgânica natural pela concorrência com os radicais $\cdot$OH, formados a partir da oxidação do H_2O_2. Contudo, cabe citar que os autores empregaram doses de UV muito baixas (35 kJ m^{-2}).

As curvas dose-resposta, obtidas através do ensaio YES, para todos os experimentos do planejamento experimental estão descritas na Figura 35.

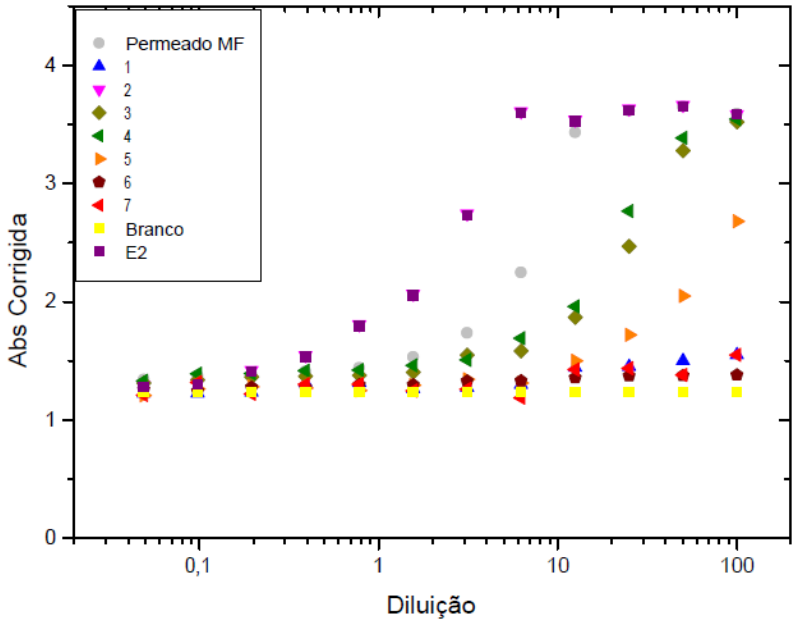


Figura 35. Curvas dose-respota dos experimentos do planejamento experimental, incluindo o permeado da MF.

A interação das variáveis dose de UV e concentração inicial de H_2O_2, na remoção dos estrogênios, em termos de concentração de E2, EE2 e E3, nas amostras tratadas, pôde ser avaliada perante a construção de gráficos 3D (Figura 36). A significância estatística dos fatores e de suas interações foram analisadas perante a equação da reta construída pelo programa Design Expert 9.0 (Tabela 33), com as devidas otimizações. Os gráficos de Pareto, para cada resposta de concentração de estrogênios, são apresentados no Apêndice IV.

A partir das Figuras 36, 37 e 38, pôde-se visualizar que as melhores respostas, ou seja, as menores concentrações de E2, EE2 e E3 são alcançadas em maiores doses de UV e a menores concentrações de H_2O_2.

A equação da reta, relativa a cada resposta, bem como o R e o R^2 fornecidos, através do planejamento experimental, estão expostos na Tabela 33.

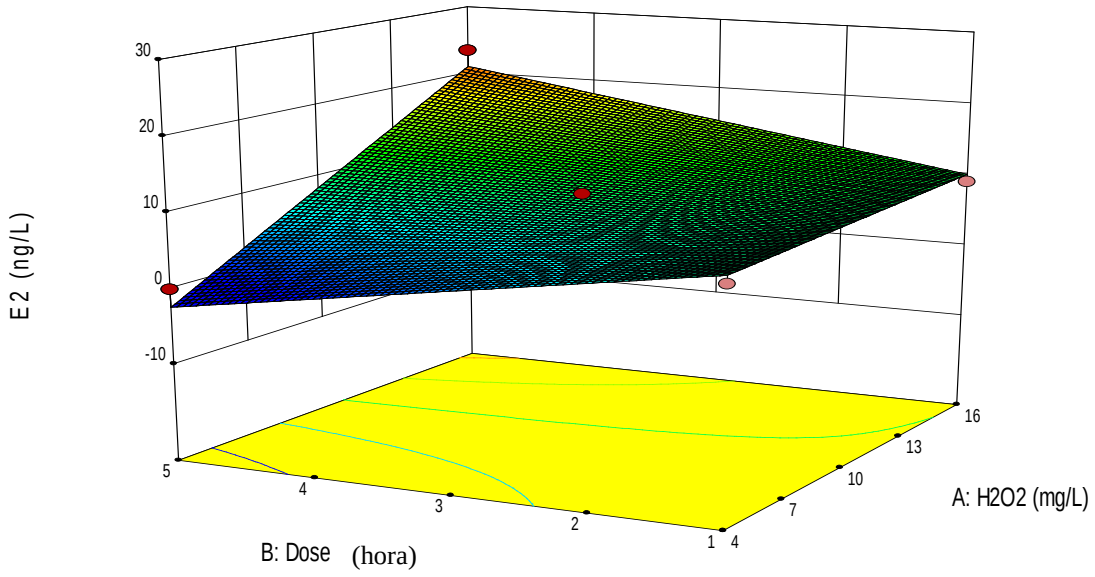


Figura 36. Gráfico 3D que relaciona a dose de UV e a concentração de H_2O_2 e de E2.

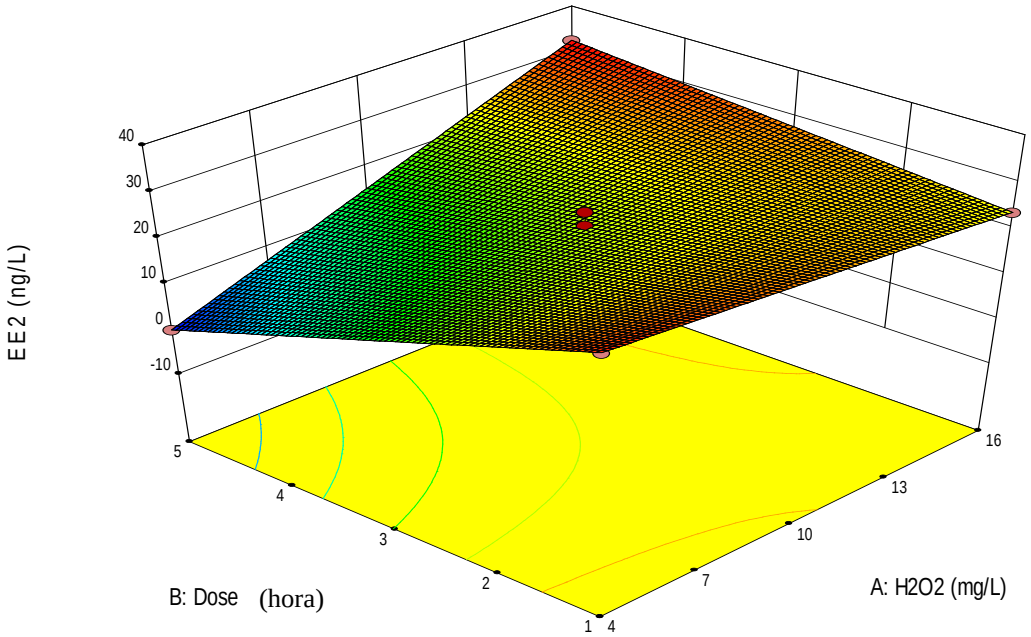


Figura 37. Gráfico 3D que relaciona a dose de UV e a concentração de H_2O_2 e de EE2.

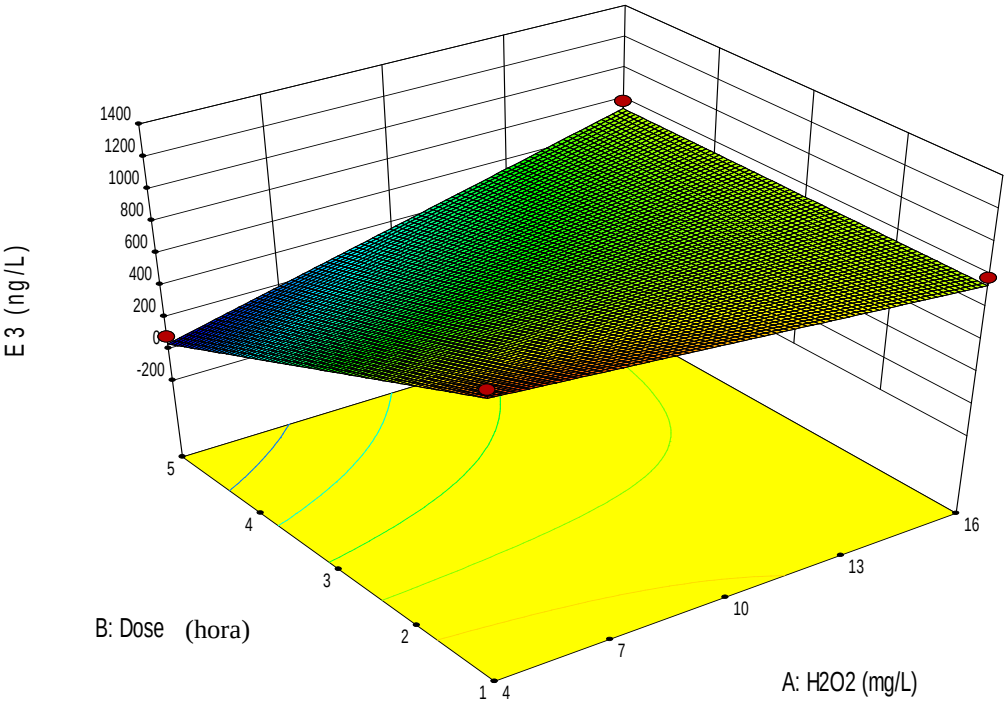


Figura 38. Gráfico 3D que relaciona a dose de UV e a concentração de H_2O_2 e de E3.

Tabela 33. Equação da reta (em fatores codificados), R^2 e R obtidos a partir do planejamento experimental.

	E2	EE2	E3
Equação linear (fatores codificados)	$y = 9{,}4 + 6{,}3A + 5{,}5AB$	$y = 22{,}0 + 6{,}3A - 5{,}6B + 9{,}93AB$	$y = 643{,}8 + 110{,}7A - 244{,}3B + 244{,}9AB$
R^2	0,9361	0,9817	0,9592
R	0,9041	0,9634	0,9185

A = H_2O_2; B = UV; AB = H_2O_2 . UV

Para o E2, a variável dose de UV (B), não foi significativa, sendo então removida da equação (Tabela 33). Observa-se, neste caso, que a variável H_2O_2 (A) e a interação entre as duas (AB) foram as que influenciaram de forma positiva a concentração de E2 (o emprego somente da fotólise não fornece remoções significativas de E2). Ou seja, nesse planejamento experimental, resposta positiva significa maiores concentrações de estrogênios, representando as menores remoções atingidas. Nesse sentido, percebe-se que a concentração de peróxido de hidrogênio possui influência mais expressiva na reação, de modo negativo à remoção de E2, do que a dose de UV. Essa relação foi obtida, pois, somente uma condição apresentou concentração de E2 maior que o LQ. Condição essa, que empregou as maiores doses de H_2O_2 (ver Tabela 32)

Diferentemente, para o EE2, a dose de UV foi significativa, em termos positivos para a sua remoção. Contudo, as concentrações de H_2O_2 e a interação UV/H_2O_2 foram os parâmetros mais expressivos, de modo negativo, à remoção de EE2. Ou seja, a aplicação de UV/H_2O_2 fornece melhores respostas de remoção para menores valores de H_2O_2 e maiores doses de UV.

Analisando o E3 percebe-se a mesma tendência que o EE2, entretanto, no primeiro caso, a variável dose de UV possui maior influência, de forma positiva, para os resultados de remoção de E3.

A partir dos resultados obtidos, decidiu-se por avaliar a eficiência da fotólise direta na remoção dos estrogênios. Os resultados mostraram que para 122,4 kJ m^{-2} foram removidos 95 e 51 % de E2 e E3 (o EE2 ficou abaixo do LD da amostra de efluente de ETE, do permeado da MF e após a aplicação de UV em doses de 122,4 kJ m^{-2}). Esses percentuais comprovam a

necessidade de injeção de H_2O_2, mesmo que mínimo, para aumentar a eficiência do processo, pela formação de radicais $\cdot OH$.

Rosenfeldt et al. (2007) concluem que a adição de H_2O_2, comparada à fotólise direta, aumenta a eficiência de remoção de E2 e EE2, para águas sintéticas. Para águas naturais, no entanto, a taxa de degradação, desses estrogênios, é retardada, diminuindo assim, a eficiência de remoção.

Por fim, pode-se afirmar que os resultados obtidos, a partir do planejamento experimental, indicam a necessidade de novos testes empregando menores faixas de concentração de peróxido de hidrogênio, a fim de se promover a total remoção de E3, concomitante à remoção de atividade estrogênica.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho estudou o emprego de OI e UV/H_2O_2 na remoção de E2, EE2, E3 e atividade estrogênica (medida pelo ensaio YES) presentes em esgoto doméstico biotratado, em escala de bancada.

A metodologia analítica de cromatografia em equipamento de CLAE se mostrou satisfatória para determinação de E2, EE2 e E3 em efluente de ETE. Os testes de validação forneceram valores de R e R^2 maiores que 0,99, bem como recuperações acima de 68%. Problemas com interferentes foram detectados quando se analisou concentrações de ng L^{-1}, que forneceram recuperações maiores que 100%. A presença de E2, EE2 e E3, em efluente de ETE, variou de concentrações < LD, para os dois primeiros, a 1876,4, 79,3 e 2210,2 ng L^{-1}.

O sistema de OI não foi capaz de remover completamente os estrogênios. Esse fato leva a hipótese de que o fenômeno de adsorção esteja ocorrendo, o que poderia levar a presença de orgânicos e a elevada atividade estrogênica no permeado da OI.

O estudo do pH, em solução sintética de estrogênios, apresentou elevadas rejeições (concentrações abaixo do LD) para os três DE em pH 5 e 11. Assim, descartou-se a etapa de ajuste de pH nos testes com a matriz ambiental.

A avaliação da recuperação (50, 60 e 70%) forneceu elevadas rejeições (acima de 91%) somente para o E3. Para o EE2 as rejeições obtidas estiveram abaixo de 60%, havendo decaimento conforme o aumento da recuperação. Para o E2, somente em recuperação de 60% conseguiu-se rejeições acima de 93%, sendo sua concentração no permeado abaixo do LD.

O estudo da remoção de E2, EE2, E3 e atividade estrogênica por UV/H_2O_2 foi realizado em duas etapas. Contudo, somente na segunda, que empregava pré-tratamento por MF, obteve-se a melhor condição (maior dose de UV, 122,4 kJ m^{-2}, e menor concentração de H_2O_2, 4 mg L^{-1}) de remoção dos estrogênios (concentrações abaixo do LD para E2 e EE2 e remoção de 90% de E3).

De forma geral, o processo oxidativo empregado mostrou maior eficiência de remoção dos estrogênios em comparação ao sistema de separação por membrana de OI. Contudo, o mesmo não foi observado para a atividade estrogênica, que aumentou na melhor condição de remoção de E2, EE2 e E3.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O grande desafio apresentado nesta dissertação deveu-se à remoção de concentrações traço (ng L^{-1}) de estrogênios presentes em esgoto doméstico biotratado. Contudo, essa elevada dificuldade pode ser atribuída ao emprego, de forma única e separada, dos processos de tratamento terciários.

Assim, como sugestão para trabalhos que visem a remoção de micropoluentes em matrizes ambientais, pode-se destacar o acoplamento de técnicas, como o tratamento do permeado da OI por UV/H_2O_2 em efluentes de ETE. É provável que essa junção de tecnologias forneça a remoção total do efeito de atividade estrogênica, pela presença em pequena quantidade de orgânicos no permeado da OI.

É importante citar, também, a necessidade de se estudar a aplicação de concentrações menores (1 a 4 mg L^{-1}) de H_2O_2 no POA conduzido. Problemas de reações secundárias podem ser evitados com menores doses de H_2O_2, o que diminuiria o efeito de atividade estrogênica.

É relevante destacar a necessidade de obtenção e averiguação das cinéticas de degradação dos estrogênios estudados em matriz ambiental, pelo emprego de H_2O_2/UV.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, A.; BORRELL, A. Abnormally high polychlorinated Biphenyl levels in striped dolphins (Steneua Coeruleoalba) affected by the 1990-1992 Mediterranean Epizootic. **Science of the Total Environmental**, v. 154, p. 237-247, 1994.

AL-RIFAI, J. H.; KHABBAZB, H.; SCHÄFERC, A. I. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in a water recycling process using reverse osmosis systems. **Separation and Purification Technology** , v. 77 , p. 60–67, 2011.

AMORIM, F. F. **Remoção dos contaminantes orgânicos b-estradiol e saxtoxinas (STX, Neo-STX e dc-STX) por meio de nanofiltração:** avaliação em escala de bancada. Brasília: Universidade de Brasília, UnB - Faculdade de Tecnologia, 2007. 133 p. Dissertação de Mestrado.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio. Brasil: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo. 2003.

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewatrer**. 22. ed. Washington, DC: [s.n.], 2012.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 18, p. 187-204, 2013. ISSN 3.

ATKINSON, S. K. et al. The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment** , v. 430, p. 119–125, 2012.

BAKER, R. W. **Membrane technology and applications**. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

BAKER, V. A. Endocrine Disrupters - testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 413-419, 2001.

BELGIORNO, V. et al. Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. **Desalination**, v. 215 , p. 166–176, 2007.

BILA, D. et al. Estrogenic activivity removal of 17b-estradiolby ozonation and identification of by-products. **Chemosphere**, v. 69, p. 736-746, 2007.

BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β-estradiol pelo processo de ozonização**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro/COOPE, 2005. 281 p. Tese de Doutorado.

BILA, D.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge Treatment Processes**. London: CRC Press LLC, 2003.

BRANDT, E. M. F. et al. Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 718-726, 2013.

CARLSON, J. C. et al. Direct UV photolysis of select pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in aqueous solution. **Water Research**, v. 84, p. 350-361, 2015.

CARTAGENA, P. et al. Reduction of emerging micropollutants, organic matter, nutrients and salinity from real wastewater by combined MBR–NF/RO treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 132–143, 2013.

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

CHON, K.; CHO, J.; SHON, H. K. A pilot-scale hybrid municipal wastewater reclamation system using combined coagulation and disk filtration, ultrafiltration, and reverse osmosis:

Removal of nutrients and micropollutants, and characterization of membrane foulants. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 109–116, 2013.

CHON, K.; KYONGSHON, H.; CHO, J. Membrane bioreactor and nanofiltration hybrid system for reclamation of municipal wastewater: Removal of nutrients, organic matter and micropollutants. **Bioresource Technology** , v. 122, p. 181–188, 2012.

CLARA, M. et al. Adsorption of bisphenol-A, 17b-estradiole and 17a-ethinylestradiole to sewage sludge. **Chemosphere**, v. 56, p. 843-851, 2004.

CLARA, M. et al. The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. **Water Res.**, v. 39, p. 97–106, 2005. doi:10.1016/j.watres.2004.08.036.

CNRH. Moção n° 61: Recomenda ações de ciência e tecnologia para melhoria de técnicas de monitoramento e de tratamento de água de abastecimento e de efluentes, visando a remoção de micropoluentes emergentes e remoção de microrganismos patogênicos emergentes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 165, DOU, seção 1, p. 36, 2012.

COMERTON, A. M. et al. Membrane adsorption of endocrine disrupting compounds and pharmaceutically active compounds. **Journal of Membrane Science** , v. 303, p. 267–277, 2007.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente, resolução n° 430, de Maio de 2011**. [S.l.]: [s.n.], 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução n° 357, de Março de 2005, co Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

DANIEL, M. S.; LIMA, E. C. Determinação simultânea de estriol b-estradiol, 17a-etinilestradiol e estrona empregando-se extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Ambiente e Água**, v. 9, n. 4, 2014.

DE LA CRUZ, N. et al. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. **Water Research**, v. 46, p. 1947-1957, 2012.

DE LA CRUZ, N. et al. Degradation of emerging contaminants by UV, UV/H2O2 and neutral photo-Fenton at pilot scale in a dosmetic wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 47, p. 5836-5845, 2013.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. Z.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova Escola**, 1998. ISSN 7.

DOLAR, D. et al. Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an. **Journal of Hazardous Materials** , v. 239– 240 , p. 64– 69, 2012.

FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). **Environmental Science Pollution Research**, v. 16, p. 593-603, 2009.

FROEHNER, S. et al. Removal Capacity of Caffeine, Hormones, and Bisphenol by Aerobic and Anaerobic Sewage Treatment. **Water Air Soil Pollut**, v. 216, p. 463–471, 2011.

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.

FRY, D. M.; TOONE, C. K. DDT-induced feminization of gull embryos. **Science**, v. 213, p. 922-924, 1981.

GARCIA, N. et al. The application of microfiltration-reverse osmosis/nanofiltration to trace organics removal for municipal wasterwater reuse. **Environmental Technology**, v. 34-24, p. 3183-3189, 2013.

GLAZE, W. H.; KANG, J. W.; CHAPIN, D. H. The chemistry of water treatment processes involving Ozone, hydrogen peroxide and UV-radiantion. **Ozone: Science and Engineering**, v. 9, p. 335-352, 1987.

GÜLTEKIN, I.; INCE, N. H. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. **Journal of Environmental Management**, v. 85 , p. 816–832, 2007.

GUR-REZNIK, S. et al. Influence of seasonal and operating conditions on the rejection of pharmaceutical active compounds by RO and NF membranes. **Desalination** , v. 277, p. 250–256, 2011.

HAI, F. I. et al. Trace Organic Contaminants Removal by Combined Processes for Wastewater Reuse. **Enviroment Chemistry**, v. 318, 2014.

HALLDIN, K. et al. Reproductive impairment in Japonese quail (Coturnix japonica) after in ovo exposure to o,p'-DDT. **Archives Toxicology**, v. 77, p. 116-122, 2003.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, v. 46, p. 5813-5833, 2012.

HARBERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003.

HATEF, A. et al. Adverse effects of bisfenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 56-62, 2012.

HEO, J. et al. Comparison of flux behavior and synthetic organic compound removal by forward osmosis and reverse osmosis membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 443, p. 69=82, 2013.

HERRERA, A. Y.; MATHER, M. Actions and interactions of estradiol and glucocorticoids in cognition and the brain: Implications for aging women. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** , v. 55, p. 36-52, 2015.

HUANG, H. et al. Effects of feedwater pretreatment on the removal of organic microconstituents by a low fouling reverse osmosis membrane. **Desalination** , v. 281, p. 446–454, 2011.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 3. ed. [S.l.]: Coordenação Geral de Acreditação, 2010. DOQ-CGCRE-008.

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

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.

JIN, S. et al. Enhanced effects by mixtures of three estrogenic compounds at environmentally relevant levels on development of Chinese rare minnow (Gobiocyprisrarus). **Environment Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 277-283, 2012.

JOHNSON, I.; HARVEY, P. **Study on the Scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupt priority list of actions**. [S.l.]: WRc-NSF, 2002.

JUDD, S.; JEFFERSON, B. **Membranes for Industrial Wasterwater Recovery and Re-use**. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2003.

KEEN, O. S. et al. Enhanced biodegradation of Carbamazepine after UV/H2O2 advanced oxidation. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 6222-6227, 2012.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Performance of UV and UV/H2O2 processes for the removal of pharmaceuticals detected in secoundary effluent of a sewage treatment plant in Japan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 1134-1140, 2009.

KIM, S. E.; YAMADA, H.; TSUNO, H. Evaluation of estrogenicity for 17b-estradiol decomposition during ozonation. **Ozone Science**, v. 26, p. 563-571, 2004.

KIMURA, K. et al. Rejection of organic micropollutants (disinfection by-products, endocrine disrupting compounds, and pharmaceutically active compounds. **Journal of Membrane Science** , v. 227, p. 113-121, 2003.

KIMURA, K. et al. Rejection of neutral endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceutical active compounds (PhACs) by RO membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 245, p. 71–78, 2004.

KLÜPFEL, A. M.; FRIMMEL, F. H. Nanofiltration of river water — fouling, cleaning and micropollutant rejection. **Desalination** , v. 250 , p. 1005–1007, 2010.

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

KUMAR, V. et al. The arrival and discharge of conjugated estrogens from a range of different sewage treatment plants in the UK. **Chemosphere**, v. 82, p. 1124-1128, 2011.

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

LAU, T. K.; CHU, W.; GRAHAM, N. The degradation of endocrine disruptor di-n-butil phthalate by UV irradiation: A photolysis and product study. **Chemosphere**, v. 60, p. 1045-1053, 2005.

LEE, C. O.; HOWE, K. J.; THOMSON, B. M. Ozone and biofiltration as an alternative to reverse osmosis for removing PPCPs and micropollutants from treated wastewater. **Water Research**, v. 46, p. 1005-1014, 2012.

LI, N. N. et al. **Advanced Membrane Technology and Applications**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2008.

LIMA, D. L. D. et al. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. **Talanta**, v. 115, p. 980-985, 2012.

LINARES, R. V. et al. Rejection of micropollutants by clean and fouled forward osmosis membrane. **Water Research**, v. 45, p. 6737-6744, 2011.

LINSKY, R. **UV 2000:** A Technical Symposium. California: National Water Research Institute, 2000.

LISBOA, N. S. et al. A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters. **Talanta**, v. 117, p. 168–175, 2013.

LIU, C. et al. Characterization of a bystander effect induced by the endocrine-disrupting chemical 6-propyl-2-thiouracil in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 118-119, p. 108-115, 2012.

LIU, P. et al. Removal of trace antibiotics from wastewater: A systematic study of nanofiltration combined with ozone-based advanced oxidation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p. 211–220, 2014.

LIU, S. et al. Effects of 17a-ethinylestradiol and bisphenol A on steroidogenic messenger ribonucleic acid levels in the minnow gonads. **Aquatic Toxicology**, v. 122-123, p. 19-27, 2012.

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

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 60, p. 385–393, 2011.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros:** determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers Ltda, 2001.

LUINE, V. Estradiol: Mediator of memories, spine density and cognitive resilience to stress in female rodents. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 2015.

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

MALLEVIALLE, J.; ODENDAAL, P. E.; WIESNER, M. R. **Water Treatment Membrane Processes**. Nova York: Lyonnaise des Eaux – LdE, 1996.

MANAHAN, S. E. **Environmental Chemistry**. 8. ed. New York: CRC Press LLc, 2005.

MANICKUM, T.; JOHN, W. Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrined isrupting compounds at the wastewater treatment works inPietermaritzburg (South Africa). **Science of th Total Environmental**, v. 468-469, p. 584-597, 2014.

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

MIERZWA, J. C.; AQUINO, S. F. Contaminantes Orgânicos Presentes em Microquantidades em Manaciais de Água para Abastecimento Público. In: PÁDUA, V. L. **Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. 1° Edição. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2009. Cap. 2, p. 392. Projeto PROSAB.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2º. ed. Dordrecht: KluwerAcademic Publishers, 2000.

MUNTER, R. Advanced Oxidation Processes - Current Status and Prospects. **Proceeding of the Estonia Academy of Sciences**, v. 50, n. 2, p. 59-80, 2001.

NATH, K. **Membrane Separation Processes**. New Delhi: PHI Learning Pvt. Ltd., 2008.

NGHIEM, L. D. et al. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. **Journal of Membrane Science** , v. 242 , p. 37–45, 2004.

NOBLE, R. D.; STERN, S. A. A. **Membrane Separations Technology:** Principles and Applications. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 1999.

NOGUEIRA, R. F. P.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Sample and fast spectrophotometric determination of H2O2 in photofenton reactions using matavanadate. **Talanta**, v. 66, p. 86-91, 2005.

OLIVEIRA, M. M. **Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na Bacia de Jacarepaguá, RJ**. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ- PAMB, 2015. Dissertação de Mestrado.

PATROLECCO, L. et al. Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. **Microchemical Journal** , v. 107, p. 165–171, 2013.

PEREIRA, R. O. et al. Removal os estrogens through water desifection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, p. 789-799, 2011.

PEREIRA, S. V. **Degradação da Atrazina pelo processo UV/H2O2 e Ozônio, identificação dos intermediários e avaliação da atividade estrogênica**. Rio de Janeiro: UFRJ/COOPE, 2011. 168 p. Tese de Doutorado.

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.

PICKERING, A. D. et al. **Community programme of research on endocrine disrupters and environmental hormones (COMPREHEND)**. European Commission. [S.l.]. 2002. (ENV4-CT98-0798).

PORTER, M. C. **Handbook of Industrial Membrane Technology**. [S.l.]: Noyes Publications, 1998.

POURAN, S. R.; AZIZ, A. R. A.; DAUD, W. M. A. W. Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewater. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 53-59, 2015.

PUY-AZURMENDI, E. et al. Endocrine disruption in thicklip grey mullet (Chelon Labrosus) from the Urdaibai biosphere reverse (Bay of Biscay, Southwestern Europe). **Science of The Total Environment**, v. 443, p. 233-244, 2013.

ROBERTS, J. et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and flow. **Science of the Total Environmental** , v. 541, p. 1625-1627, 2016.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Pharmaceuticals and pesticides in reclaimed water: Efficiencyassessment of a microfiltration–reverse osmosis (MF–RO) pilot plant. **Journal of Hazardous Materials** , v. 282 , p. 165–173, 2015.

ROSARIO-ORTIZ, F. L.; WERT, E. C.; SNYDER, S. A. Evaluation of UV/H2O2 Treatment forthe Oxidation of pharmaceuticals in wastewater. **Water Research**, v. 44, p. 1440-1448, 2010.

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

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 241–248, 1996.

SADMANI, A. A. H. M.; ANDREWS, R. C.; BAGLEY, D. M. Influence of naturally occurring dissolved organic matter, colloids, and cations on nanofiltration of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds. **Chemosphere**, v. 117 , p. 170–177, 2014.

SAHAR, E. et al. The use of RO to remove emerging micropollutants following CAS/UF or MBR treatment of municipal wastewater. **Desalination** , v. 273 , p. 142–147, 2011.

SANCHES, S. et al. Assessment of phenomena underlying the removal of micropollutants during water treatment by nanofiltration using multivariate statistical analysis. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 377–386, 2013b.

SARAVANABHAVAN, G.; HELLEUR, R.; HELLOU, J. GC–MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall. **Chemosphere**, v. 76, p. 1156-1162, 2009.

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.

SCHÄFER, A. I.; AKANYETI, I.; SEMIÃO, A. J. C. Micropollutant sorption to membrane polymers: A review of mechanisms for estrogens. **Advances in Colloid and Interface Science** , v. 164 , p. 100–117, 2011.

SCHÜßELER, T. **Macherey-Nagel**, 2016. Disponivel em: <ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/SPE/SPE_Applis.pdf>. Acesso em: 12 Janeiro 2016.

SERVOS, M. R. et al. Distribution of estrogens, 17b-Estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of The Total Environmental**, v. 336, p. 155-170, 2005.

SHANMUGANATHAN, S. et al. Experimental evaluation of microfiltration–granular activated carbon (MF–GAC)/nano filter hybrid system in high quality water reuse. **Journal of Membrane Science**, v. 476, p. 1–9, 2015.

SHU, Z. et al. Photodegradation of emerging micropollutants using the medium-pressure UV/H2O2 Advanced Oxidation Process. **Water Research**, v. 47, p. 2881-2889, 2013.

SILVA, G. G. M. **Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica**. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ - PEAMB, 2015. Dissertação de mestrado.

SILVA, L. L. S. **Desreguladores endócrinos em águas de abastecimento:** comparação entre as legislações Brasileira e Americana. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química, EQ, 2014. Monografia de conclusão de curso.

SIM, W.-J. et al. Assessment of fates of estrogens in wastewater and sludge from various types of wastewater treatment plants. **Chemosphere**, v. 82, p. 1448-1453, 2011.

SIMON, A. et al. Effects of membrane degradation on the removal of pharmaceutically active Effects of membrane degradation on the removal of pharmaceutically active. **Journal of Membrane Science** , v. 340 , p. 16–25, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de Análisis Instrumental**. 5. ed. Madrid: Interamericana de España, S.A.U., 2001.

SNYDER, S. A. et al. **State of Knowledge fo Endocrine Disruptors an Pharmaceuticals in Drinking Water**. Denver: AwwaRF, 2008.

SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 2, p. 87-196, 2007.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p. 57–67, 2010.

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

SOUZA, N. C. **Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais**. Fortalez: Universidade Federal do Ceará/Centro de Tecnologia , 2011. 183 p. Tese de Doutorado.

STAFIEJ, A.; PYRZYNSKA, K.; REGAN, F. Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 985 – 991, 2007.

STEVENSON, J. C.; PANAY, N.; PEXMAN-FIETH, C. Oral estradiol and dydrogesteronecombination terapy in postmenopausal women: Review of efficacyand safety. **Maturitas**, v. 76, p. 10-21, 2013.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.

SUI, Q. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. **Water Research**, v. 44, p. 417-426, 2010.

TANGTIAN, H. et al. Estrogenic potential of benzotriazole on marine medaka (Oryziasmelastigma). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 327-332, 2012.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TESKE, S. S.; ARNOLD, R. G. Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastwater treatment. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, p. 107-124, 2008.

THE UV/Oxidation Handbook. Ontario: Solarchem Environmental System, 1994.

TIAN, H. et al. Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male grupppies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, p. 163-170, 2012.

UE. **Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu. Altera as diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE são alterados como substâncias prioritárias no domínio da política da água**. Jornal Oficial. [S.l.]: [s.n.]. 2013. p. 1-17.

USEPA. **Advanced Photochemical Oxidation Process**. Washington, DC: EPA, 1998. EPA/625/R-98/004.

USEPA. Status of endocrine disruptor secreening program Tier 1 Test Orders for list 1 chemicals. **EPA**, 2015. Disponivel em: <http://www2.epa.gov/endocrine-disruption/status-endocrine-disruptor-screening-program-tier-1-test-orders-list-1>. Acesso em: Dezembro 2015.

USEPA. What is Endocrine Disruption? **EPA**, 2015. Disponivel em: <http://www2.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>. Acesso em: Dezembro 2015.

VARMA, R. S. List of Publication. **United State Environmental Protection Agency (USEPA)**, 2014. Disponivel em: <http://www.epa.gov/nrmrl/std/pdf/330_peer_review.pdf>. Acesso em: jan. 2015.

VOSKUHL, R. R.; PALASZYNSKY, K. Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for multiple sclerosis. **The Neuroscientist**, v. 7, p. 258-270, 2001. ISSN 3.

VYMAZAL, J.; BřEZINOVÁ, T.; KOžELUH, M. Occurrence and removal of estrogens, progesterone and testosterone in three constructed wetlands treating municipal sewage in the Czech Republic. **Science of the Total Environmental**, v. 536, p. 625-631, 2015.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine Disrupters: A human risk? **Mollecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, p. 2-9, 2005.

WATERS. Beginner's Guide to SPE [Solide Phase Extraction]. **Waters:** The Science of What's Possible, 2016. Disponivel em: <https://waters.com/waters/en_US/Primers/nav.htm?cid=10048920>. Acesso em: 12 Janeiro 2016.

WEATHERLEY, L. R. **Engineering Processes for Bioseparations**. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd, 1994.

WENZEL, A.; MÜLLER, J.; TERNES, T. Study on endocrine disrupters in drinking water. **European Commission**, 2003. Disponivel em: <http://ec.europa.eu/research/endocrine/pdf/drinking_water_en.pdf>. Acesso em: Dezembro 2015.

WILLIAMS, M. E. et al. Separation of Organic Pollutants by Reverse Osmosis and Nanofiltration Membranes: Mathematical Models and Experimental Verification. **Industrial and Engineering Chemistry Research** , v. 38, p. 3683-3695, 1999.

YAN, C. et al. Effect of colloids on the occurence, distribution and photolysis of emerging organic contaminants in wasterwaters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 299, p. 241-248, 2015.

YANGALI-QUINTANILLA, V. et al. Rejection of pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting compounds by clean and fouled nanofiltration membranes. **Water Research**, v. 43, p. 2349-2362, 2009.

YANGALI-QUINTANILLAA, V. et al. Proposing nanofiltration as acceptable barrier for organic contaminants in water reuse. **Journal of Membrane Science**, v. 362, p. 334–345, 2010.

YOUNG, W. F. et al. **Proposed predicted-no-effect-concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters**. Environment Agency's Project Manager. [S.l.]. 2004. (P2-T04/1).

ZHANG, Z. et al. Kinetic degradation model and estrogenicity changes of EE2 (17a-ethinylestradiol) in aqueous solution by UV and UV/H2O2 technology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 1127-1133, 2010.

ANEXO I

O preparo da cepa (*Saccharomyces cerevisiae*) foi realizado segundo o protocolo apresentado por Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações realizadas por Silva (2015):

- Congelamento:
    - Realizado no final de cada ensaio com a levedura que restava, para garantir que a levedura fosse congelada fresca;
    - A levedura foi colocada em tubo criogênico estéril com volume de 2 mL e adicionado glicerol previamente esterilizado a 121ºC por 15 minutos, na proporção de 40%;
    - Os tubos foram armazenados em freezer a -20ºC, onde podem ser mantidos por até 1 ano e também a -80ºC, podendo ser guardados por mais tempo, no prazo de até 5 anos.
    - Descongelamento, pré-inóculo e inoculo:
    - Descongelamento da cepa em 48 horas antes do ensaio e foi realizado o pré-inoculo;
    - Todas as células contidas no tubo criogênico foram ressuspendida em 10 mL do meio de cultivo.
    - Os frascos de cultivo foram incubados por 24 horas sob agitação, a 28ºC e 150 rpm em incubadora de bancada com agitação orbital (Marca Quimis, modelo Q816M20).
- Inóculo:
    - Realizado após 24 horas, adicionando-se 100µL da cultura inicial a um frasco contendo 10 mL de meio de cultivo.
    - Os frascos de cultivo foram incubados a 28ºC e 150 rpm em incubadora de bancada com agitação orbital (Marca Quimis modelo Q816M20) por 24 horas e assim a cepa estava pronta para ser utilizada no ensaio.

Preparo das soluções para o meio de cultivo (SILVA, 2015):

Meio mínimo: preparado adicionando-se os seguintes reagentes a 1 L de água ultrapura:

13,61 g de KH_2PO_4

1,98 g de $(NH_4)2SO_4$

4,2 g de KOH

0,2 g de $MgSO_4$

1mL de solução de $Fe_2(SO_4)_3$ (40mg/50mL de água ultrapura)

50 mg de L-leucina

50 mg de L-histidina

50 mg de adenina

20 mg de L-arginina

20 mg de L-metionina

30 mg de L-tirosina

30mg de L-isoleucina

30 mg de L-lisina-HCl

25 mg de L-fenilalanina

100 mg de ácido glutâmico

150 mg de L-valina

375 mg de L-serina.

Solução de glicose: preparada a 20% m/v (20 g/100 mL), dissolvendo a glicose em água ultrapura.

Solução de ácido L-aspártico: preparada na concentração de 4 mg mL^{-1}, com água ultrapura.

Solução de L-treonina: preparada na concentração de 24 mg mL^{-1} (600 mg/25 mL) com água ultrapura

Solução de sulfato de cobre (II): preparada na concentração de 20 mM (0,5g/100mL), com água ultrapura

Solução de vitamina: preparada adicionando-se os seguintes reagentes a 180 mL de água ultrapura:

8 mg de tiamina;

8 mg de piridoxina;

8 mg de pantetonato de cálcio;

40 mg de inositol e

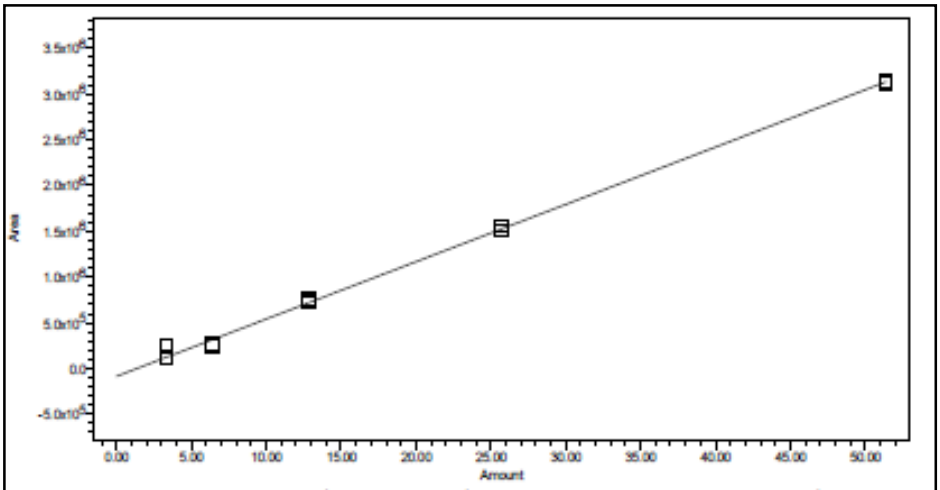
20 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL de água ultrapura).

Solução de CPRG (Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosida): feita na concentração de 10 mg mL^{-1}, utilizando água ultra pura. Foi armazenada em frascos de vidro âmbar estéreis.

O meio mínimo, as soluções de glicose, **ácido L-aspártico e L-treonina foram** esterilizadas em frascos de vidro em autoclave a 121ºC por 15 min. As soluções de sulfato de cobre (II) e de vitamina foram esterilizadas utilizando-se um kit de filtração estéril, com membrana de 0,2 μm.

As soluções de L-treonina, vitamina e de CPRG foram armazenadas à temperatura de 4ºC. Todas as demais foram armazenadas em temperatura ambiente.

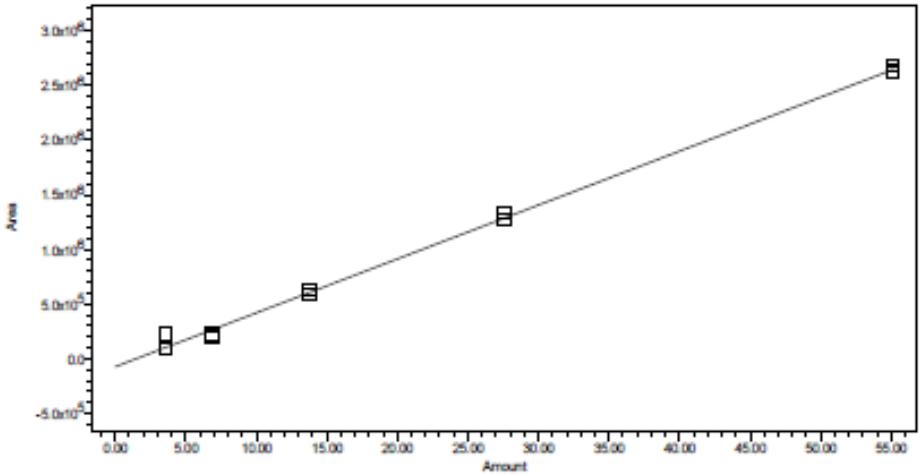
APÊNDICE I



Peak: E2

	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	E2	3	3.341	1.158e+005	3.222191	-3.565	No	No
2	E2	3	3.341	2.540e+005	5.428673	62.471	No	No
3	E2	4	6.426	2.646e+005	5.598018	-12.880	No	No
4	E2	4	6.426	2.433e+005	5.258236	-18.168	No	No
5	E2	4	6.426	2.424e+005	5.243734	-18.393	No	No
6	E2	5	12.851	7.639e+005	13.571915	5.608	No	No
7	E2	5	12.851	7.207e+005	12.881590	0.236	No	No
8	E2	5	12.851	7.454e+005	13.276496	3.309	No	No
9	E2	6	25.702	1.511e+006	25.500013	-0.788	No	No
10	E2	6	25.702	1.508e+006	25.460639	-0.941	No	No
11	E2	6	25.702	1.559e+006	26.261118	2.174	No	No
12	E2	7	51.405	3.120e+006	51.190786	-0.417	No	No
13	E2	7	51.405	3.134e+006	51.419802	0.029	No	No
14	E2	7	51.405	3.141e+006	51.521992	0.228	No	No

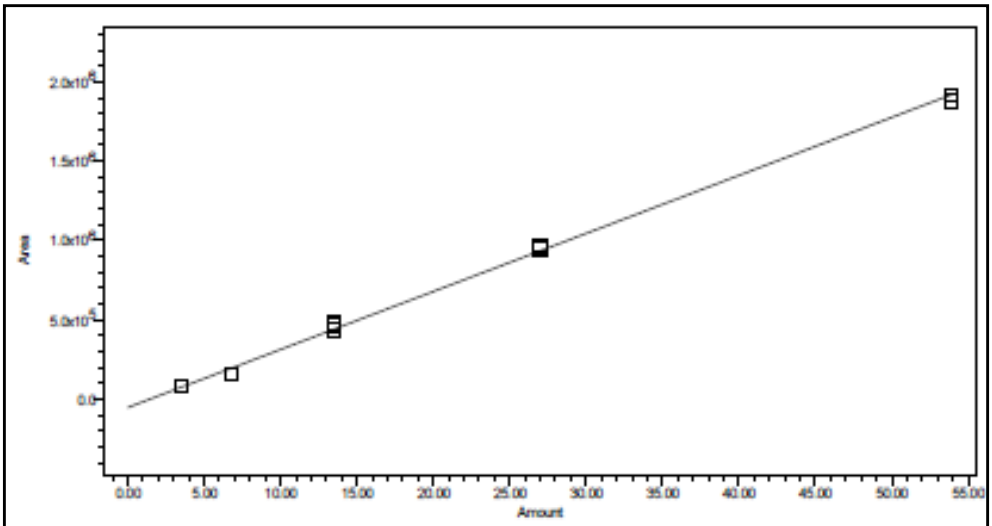
Figura 39. Curva de calibração para o E2.



Peak: EE2

	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	EE2	3	3.585	2.265e+005	6.096272	70.051	No	No
2	EE2	3	3.585	9.405e+004	3.409109	-4.906	No	No
3	EE2	4	6.894	2.233e+005	6.030108	-12.533	No	No
4	EE2	4	6.894	1.932e+005	5.419777	-21.386	No	No
5	EE2	4	6.894	2.182e+005	5.927693	-14.019	No	No
6	EE2	5	13.788	6.300e+005	14.281075	3.573	No	No
7	EE2	5	13.788	6.272e+005	14.224122	3.160	No	No
8	EE2	5	13.788	5.907e+005	13.484434	-2.204	No	No
9	EE2	6	27.577	1.277e+006	27.404195	-0.626	No	No
10	EE2	6	27.577	1.272e+006	27.305741	-0.983	No	No
11	EE2	6	27.577	1.331e+006	28.499679	3.347	No	No
12	EE2	7	55.153	2.626e+006	54.775814	-0.685	No	No
13	EE2	7	55.153	2.677e+006	55.805580	1.182	No	No
14	EE2	7	55.153	2.625e+006	54.744218	-0.742	No	No

Figura 40. Curva de calibração para o EE2.



Name: E3; Time: 3.912; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999193; R²: 0.998387; Equation: Y = 3.66e+004 X - 5.36e+004; Date Calibrated: 8/31/2015 5:29:07 PM BRT

Peak: E3

	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	E3	3	3.505	8.035e+004	3.661786	4.463	No	No
2	E3	4	6.741	1.594e+005	5.823892	-13.606	No	No
3	E3	4	6.741	1.604e+005	5.851659	-13.194	No	No
4	E3	4	6.741	1.561e+005	5.732847	-14.956	No	No
5	E3	5	13.482	4.774e+005	14.516769	7.674	No	No
6	E3	5	13.482	4.377e+005	13.431578	-0.375	No	No
7	E3	5	13.482	4.620e+005	14.095054	4.546	No	No
8	E3	6	26.964	9.486e+005	27.400095	1.617	No	No
9	E3	6	26.964	9.613e+005	27.746384	2.901	No	No
10	E3	6	26.964	9.700e+005	27.983740	3.781	No	No
11	E3	7	53.928	1.881e+006	52.896816	-1.913	No	No
12	E3	7	53.928	1.917e+006	53.872941	-0.103	No	No
13	E3	7	53.928	1.916e+006	53.839033	-0.166	No	No

Figura 41. Curva de calibração para o E3

APÊNDICE II

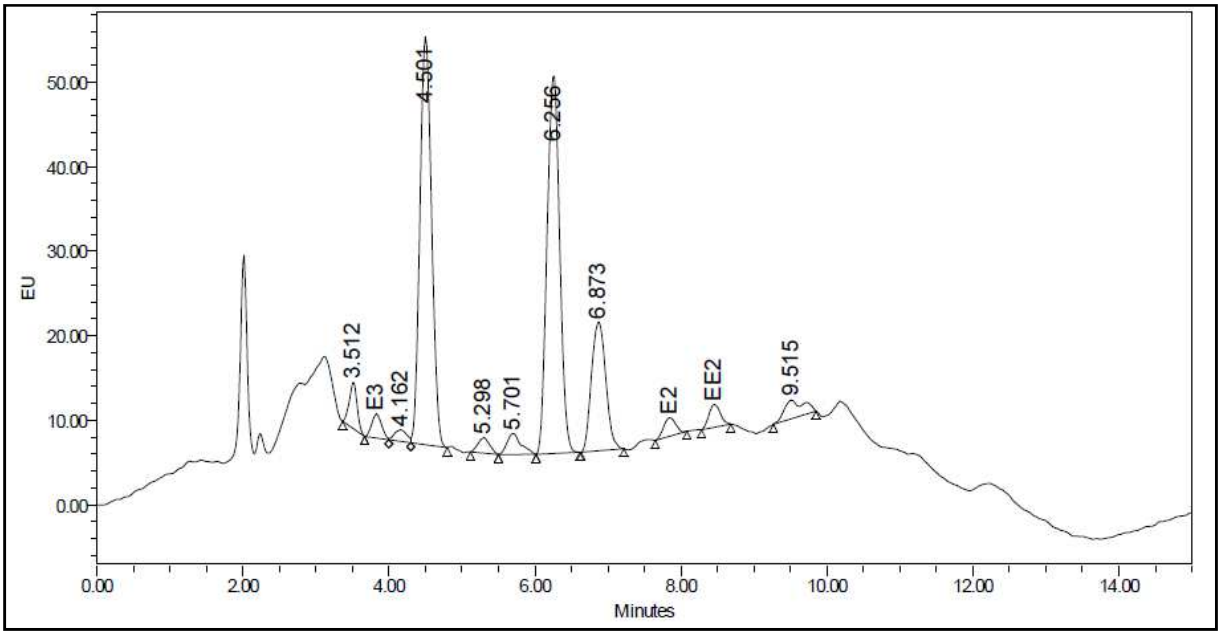


Figura 42. Cromatograma referente a amostra do permeado da OI na recuperação de 70%

APÊNDICE III

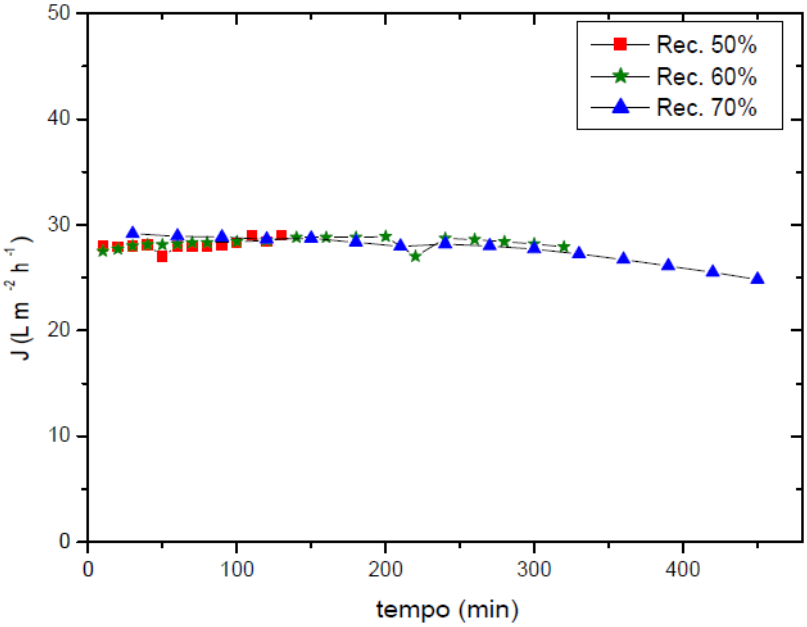


Figura 43. Relação tempo x fluxo para diferentes pressões em água ultra pura (7, 10, 12, 15 bar) e água salobra (20 bar).

Figura 44. Placa de 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra de efluente de ETE; (b) Fileiras E e G permeado da MF para as recuperações de 50 e 60%, bem como para a de 70% com volumes menores .

Figura 45. Placa 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do permeado da MF para recuperação de 70% na OI; (b) Fileiras E e G amostra do permeado da OI para recuperação de 70%

Figura 46. Placa de 96 poços para ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do concentrado da OI para recuperação de 70%; (b) Fileiras E e G curva padrão do E2.

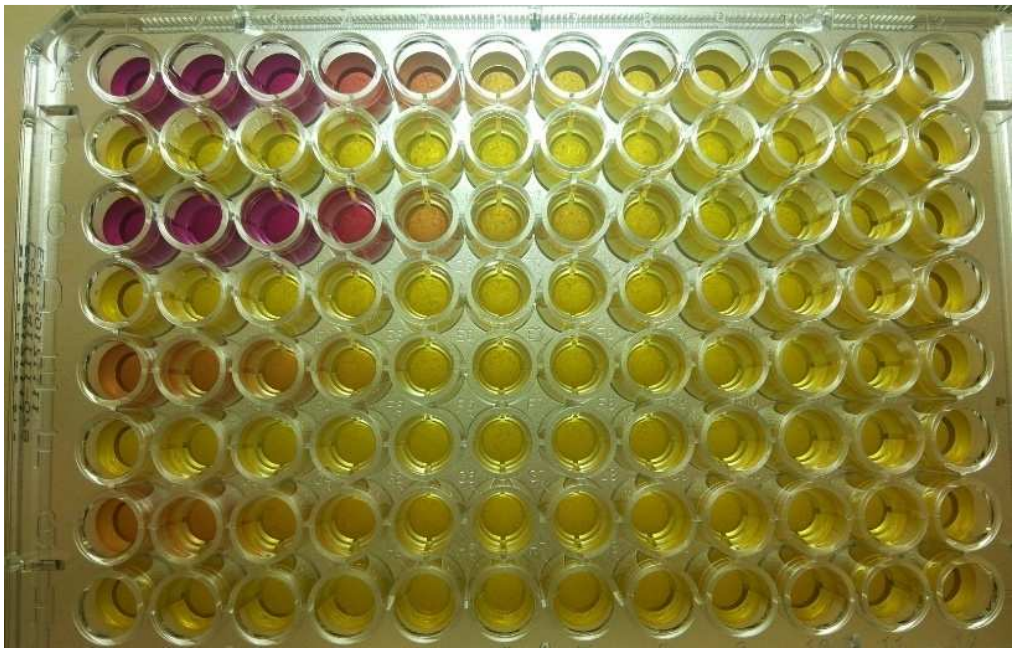


Figura 47. Placa 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do permeado da OI para recuperação de 50%; (b) Fileiras E e G amostra do concentrado da OI para recuperação de 50%.

Figura 48. Placa de 96 poços do ensaio YES: (a) Fileiras A e C amostra do permeado da OI para recuperação de 60%; (b) Fileiras E e G amostra do concentrado da OI para recuperação de 60%

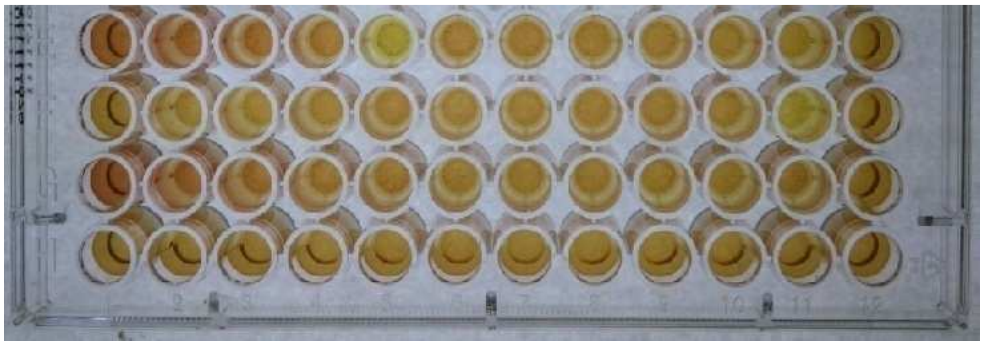


Figura 49. Placa de 96 poços do ensaio YES: Fileiras E e G amostra do permeado da OI para recuperação de 70% com volumes menores.

APÊNDICE IV

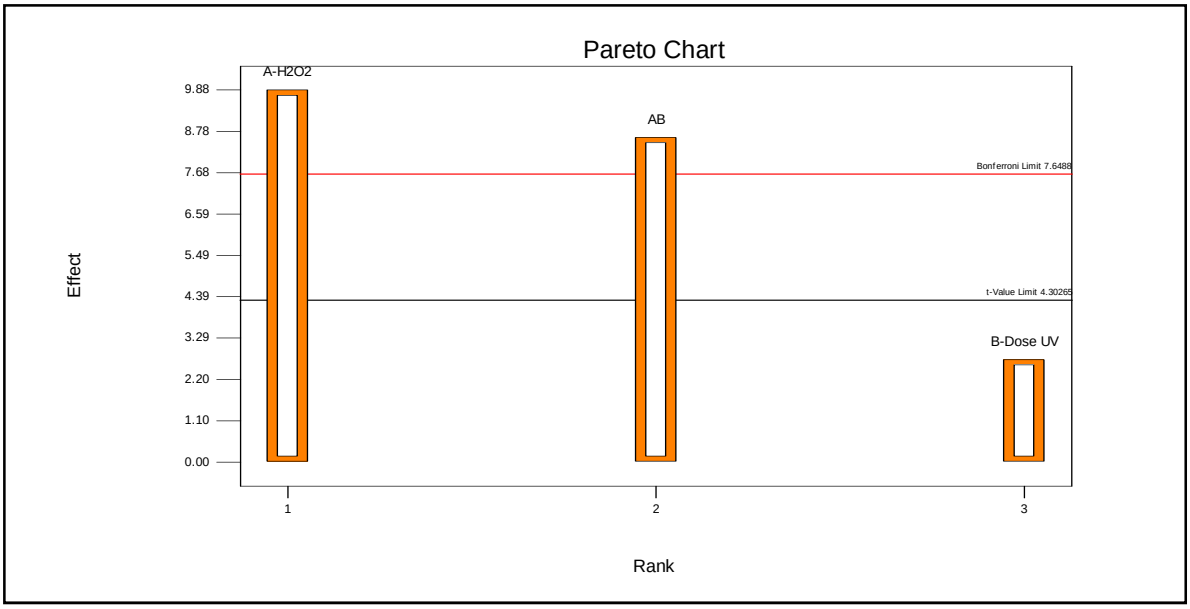


Figura 50. Gráfico de Pareto para os resultados de concentração de E2

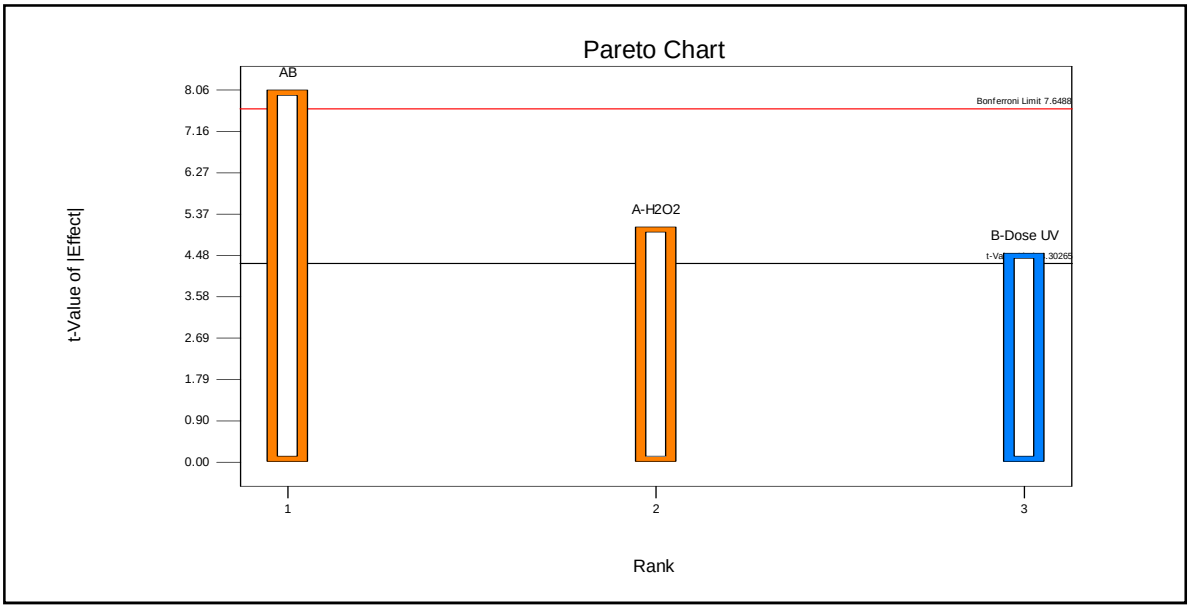


Figura 51. Gráfico de Pareto para os resultados de concentração de EE2

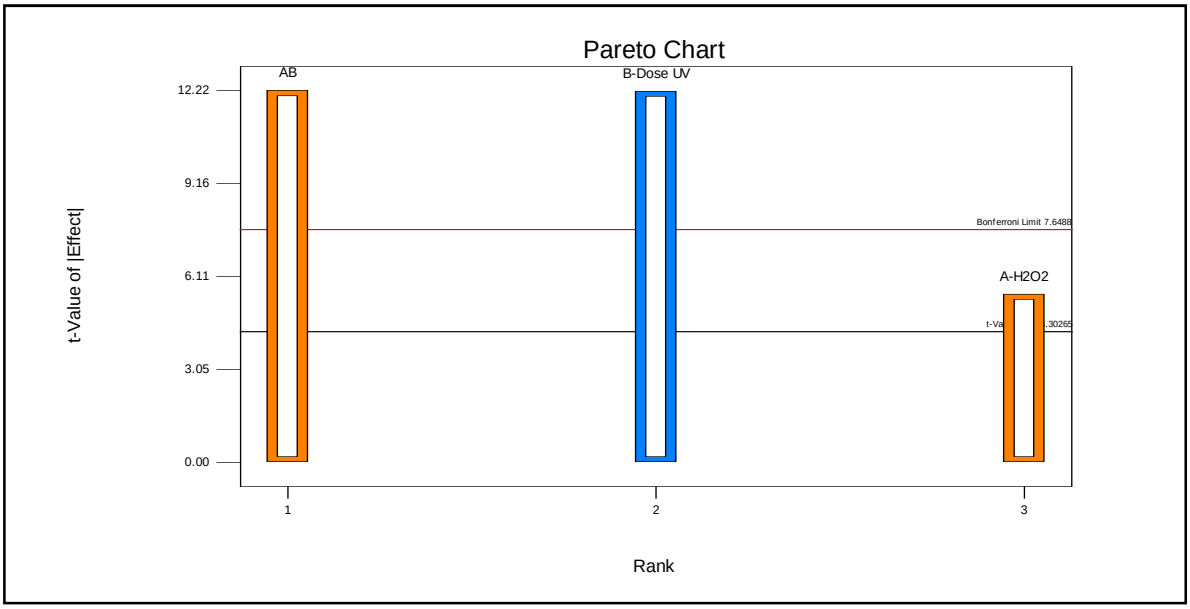


Figura 52. Gráfico de Pareto para os resultados de concentração de E3.