



Joana Portela Jorge

Licenciatura em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Contribuição para o Estudo da Remoção
de 17 β -Estradiol em água residual tratada
através da adição de Ácido Peracético**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, Perfil de Sanitária

Orientador: Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa, Professora
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de
Lisboa

Coorientador: Prof. Doutor João Paulo da Costa de Noronha,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano

Vogal e Arguente: Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz

Vogal: Prof.^a Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



Joana Portela Jorge

Licenciatura em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Contribuição para o Estudo da Remoção
de 17 β -Estradiol em água residual tratada
através da adição de Ácido Peracético**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, Perfil de Sanitária

Orientador: Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa, Professora
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de
Lisboa

Coorientador: Prof. Doutor João Paulo da Costa de Noronha,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano

Vogal e Arguente: Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz

Vogal: Prof.^a Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Contribuição para o estudo da remoção de 17 β -Estradiol em água residual tratada através da adição de Ácido Peracético

© Copyright em nome de Joana Portela Jorge da FCT/UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à VALORMED por acreditar no nosso projeto de modo a tornar as coisas possíveis.

Em segundo lugar, agradecer à Professora Doutora Rita Maurício, orientadora deste trabalho, pelo tempo disponibilizado, conhecimentos transmitidos, pelas palavras de incentivo e por acreditar em nós em toda a nossa jornada final. Não posso deixar de agradecer igualmente ao Professor Doutor João Paulo Noronha e Professor Doutor Mário Diniz pela grande ajuda na parte química e biológica, pelos novos conhecimentos que nos passaram, por todo o material e pelas horas passadas quer no gabinete como em laboratório. A ajuda de ambos foi essencial para o sucesso deste estudo. Também ao Professor Doutor António Pedro Mano pelas palavras e atitude de incentivo que sempre demonstrou.

Não queria deixar de agradecer á D. Luísa, D. Adélia, Dr^a Helena e Dr^a Maria José por todo o apoio dado em laboratório, pelas conversas e desabafos, pelos sorrisos e por terem constituído um grande apoio em todas as horas.

Flávia por tudo o que ela representou durante este ano. Pela amizade que surgiu e se intensificou ao longo do tempo, pelo apoio em todos os momentos, pela compreensão e ajuda. Não conseguia imaginar uma melhor companheira.

A todos os meus amigos que contribuíram para que o percurso académico fosse o melhor. Muito obrigada.

Aos meus pais, ao meu Mano e à Ana que nunca me deixaram cair quando mais precisei, que sempre me motivaram a ser mais e melhor, a dar sempre o melhor de mim. Aos meus pais, principalmente, por me terem proporcionado esta oportunidade de poder estudar na faculdade. Devo tudo.

Ao Marcelo, pelo amor e por me acompanhar sempre em todas as caminhadas. Que venham mais, juntos.

Resumo

Com o crescimento exponencial da população mundial observado nas últimas décadas, e a crescente concentração das populações em cidades, aumentou proporcionalmente a necessidade de produção de água para consumo humano. Como consequência, a reutilização de águas residuais tornou-se cada vez mais uma solução viável para o problema da escassez de água.

No entanto, a matriz de água residual é bastante complexa, e nela estão presentes diversos micropoluentes que têm origem do consumo de fármacos e produtos de higiene pessoal, hormonas esteróides, entre outros compostos, passíveis de causar disrupção endócrina quer na fauna do meio recetor, quer nos seres humanos.

O 17β -Estradiol faz parte da categoria de hormonas esteróides e classifica-se como sendo um estrogénio de fonte natural, produzido pelo sistema endócrino feminino, responsável pela regularização do sistema reprodutor. É excretado sobretudo através da urina e fezes. As consequências da exposição a este tipo de compostos são a feminização dos machos, em particular de espécies ícticas, impacte na sua função reprodutiva e decréscimo populacional. Nos seres humanos estas consequências são traduzidas no aumento da incidência de cancro da mama, próstata e ovários, bem como a diminuição da quantidade de esperma e malformações no sistema reprodutivo.

A remoção destes compostos das águas residuais é, maioritariamente, realizada nas Estações de Tratamento de Águas Residuais, no entanto, os processos de tratamento convencionais não conseguem atingir eficiências de remoção adequadas para uma eliminação eficaz destes compostos. Apenas com tratamentos avançados, nomeadamente tratamentos multi barreira e oxidações avançadas é que se conseguem obter resultados satisfatórios.

Um dos oxidantes mais eficazes e mais utilizado é o Cloro. Contudo, este ao reagir com a matéria orgânica presente nas águas residuais produz trihalometanos. Estes compostos possuem propriedades cancerígenas e mutagénicas. O Ácido Peracético (PAA) mostrou ser uma alternativa eficaz ao Cloro, produzindo subprodutos inócuos, e diversos estudos comprovam a sua eficácia na remoção de coliformes fecais e totais nas águas residuais.

Os objetivos deste estudo foram a avaliação do poder de remoção do composto 17β -estradiol recorrendo ao uso de Ácido Peracético, bem como a avaliação do potencial toxicológico dos subprodutos gerados. Para análise da remoção deste composto em águas residuais, efetuaram-se diversos ensaios Jar-Test com diferentes concentrações de PAA (1, 5, 10 e 15 mg/L) e diferentes tempos de contacto (10, 15 e 20 min). Obtiveram-se remoções do composto de 100%, com a concentração de 15 mg/L e 20 min de tempo de contato.

A componente ecotoxicológica deste trabalho foi realizada através de ensaios *in vivo* utilizando o peixe zebra (*Danio rerio*), através da análise de biomarcadores de stress oxidativo como a GST (Glutathione-S-Transferase), a peroxidação oxidativa (LPO) e a Catalase, bem como a determinação dos níveis de vitelogenina. Os resultados mostraram que o stress oxidativo causado pela exposição ao 17 β -Estradiol não é estatisticamente significativo, no entanto, este ocorre devido à presença de oxigénio ativo na composição do PAA. Os níveis de vitelogenina aumentaram, indicando o seu potencial estrogénico.

Contudo, após o tratamento com PAA o potencial de disrupção endócrina diminuiu mostrando a exequibilidade da estratégia de remoção adotada.

Palavras-Chave: 17 β -Estradiol (E2), águas residuais; compostos disruptores endócrinos (EDC), Ácido Peracético, Vitelogenina (VTG), Catalase (CAT).

Abstract

With the exponential growth of world population observed in the last few decades, along with the growing concentration of population within the cities, the need to produce more water to human consumption has risen. Therefore, the reuse of wastewater has become a reliable solution to the water scarcity problem.

However, the wastewater matrix it is very complex and in it are present a diversity of micropollutants which have origin in the consumption of pharmaceutical and personal care products (PPCP), steroid hormones and many other compounds susceptible to cause endocrine disruption, both in the fauna of the receptor environment and in human beings.

17 β -Estradiol belongs to a category of steroidal hormones and it is classified as a natural estrogen, produced by the feminine endocrine system, which is responsible for the regulation of the reproductive system. It is excreted mainly through urine and feces. The consequences of the exposure to these types of compounds are the feminization of male fish, impact in their reproductive function and population decline. The consequences in human beings are the increase of the occurrence of breast, prostate, and ovarian cancer, as well as a decrease of the sperm quantity and reproductive system malfunctions.

The removal of these compounds from wastewater it is done mainly through Wastewater Treatment Plants (WWTP), however the conventional treatment processes can't achieve the required removal efficiencies of these compounds. Therefore, it is needed a more advanced treatment such as multi barrier or advanced oxidation processes, that can successfully remove EDC.

One of the most effective oxidants, and the most used, it's Chlorine. However, the reaction of this disinfectant with organic matter still present in wastewater, can produce trihalomethanes which are known to have carcinogenic and mutagenic properties. Alternatively, Peracetic Acid (PAA) has shown to be an effective substitute to Chlorine, since its disinfection by-products are innocuous, and several studies prove its efficiency in the removal of total and fecal coliforms in wastewater.

The main goal of the present study is to evaluate the power of removal of the compound 17 β -estradiol using PAA, and to evaluate the toxicological potential of the resulting by-products. To analyze the elimination of the studied compound in wastewater, it was performed series of *Jar-test* essays using different PAA concentrations (1, 5, 10 and 15 mg/L) and different contact times (10, 15 and 20 min). The results obtained show that, with a concentration of 15 mg/L and 20 min of contact time was able to reach 100% of efficiency.

The ecotoxicological component of this study was performed through a several *in vivo* essays, using Zebra fish (*Danio rerio*) as a case study, in which oxidative stress biomarkers (Glutathione S-transferase (GST), Lipid Peroxidation (LOP) and Catalase (CAT)) were analyzed, and the levels of vitellogenin (VTG) were determined. Results show that the oxidative stressed caused by the compound 17 β -Estradiol was not statistically relevant even though it was present, and it is caused mainly by the presence of active forms of oxygen, which is one of PAA's main component. The vitellogenin levels show an increase, which confirms estrogenic potential of estradiol. Nevertheless, after PAA treatment, the estrogenic potential decreased, showing the feasibility of the adopted strategy.

Keywords: 17 β -Estradiol, E2, endocrine disrupting compounds, EDC, peracetic acid, PAA, disinfection, zebra fish, vitellogenin, catalase, SBSE, HPLC

Símbolos e Abreviaturas

AD – Água desmineralizada

AOP – Advanced Oxidation Processes

AR – Água Residual

BSA –Albumina de Soro Bovino

CDNB – 2,4-Dinitroclorobenzeno

CH₃CN – Acetonitrilo

CH₃OH – Metanol

CO₂ – Dióxido de Carbono

CQO – Carência Química de Oxigénio

CTA – Catalase

DAD – Diode array detector

DL – Dessorção Líquida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DT – Dessorção térmica

E2 – 17β-Estradiol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético

EE2 – 17α-Etinilestradiol

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

ETARI – Estações de Tratamento e Águas Residuais Industriais

EU – União Europeia

GST – Glutathione-S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography

KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

MBR – Membrane Biological Reactor

MF – Microfiltração

MO – Matéria orgânica

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato de sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaClO – Hipoclorito de Sódio

NF – Nanofiltração
OI – Osmose inversa
PAA – Ácido Peracético
PAH – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PBS – Tampão fosfato salino
PCB – Bifenilpoliclorado
PnPP – p-Nitrofenil fosfato
PPCP – Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais
ROS – Substâncias de oxigênio reativas
Rpm - Rotações por minuto
SBBGR – Sequencing Biofilter Batch Granular Reactor
SBSE – Stir Bar Sorptive Extraction
SST – Sólidos Suspensos Totais
STR – Solid Retention Time/Idade de lamas
TBST – Solução tampão salina Tris
THM – Trihalometanos
TiO₂ – Dióxido de Titânio
TRH – Tempo de Retenção Hidráulico
UF – Ultrafiltração
UV – Ultravioleta
VTG – Vitelogenina
NaOH – Hidróxido de sódio
MDA – Malondialdeído
SDS – Sulfato Dodecil sulfato de sódio

Índice

1. Introdução	1
1.1. Objetivos	1
1.2. Estrutura da Tese	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Sistema Endócrino	3
2.2. Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC)	5
2.3. 17β-Estradiol	7
2.4. Fontes de contaminação e principais efeitos	11
2.5. Remoção de 17β-Estradiol em sistemas de tratamento de água residual	15
2.6. Desinfecção em Águas Residuais	21
2.6.1. Importância da desinfecção	21
2.6.2. Desinfecção de Água Residual	23
2.7. Ácido Peracético: um desinfetante emergente	29
2.7.1. Propriedades físico-químicas	29
2.7.2. Subprodutos	31
2.7.3. Usos	32
2.7.4. Vantagens e Desvantagens	33
2.8. Enquadramento Legal	35
2.9. Métodos de quantificação de EDC	37
2.9.1. Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE).....	37
2.9.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD)	39
2.10. Ensaio Ecotoxicológicos	41
3. Plano Experimental	43
4. Materiais e Métodos	45
4.1. Caracterização da Água Residual	45
4.2. Materiais	45
4.3. Métodos	47
4.3.1. Curvas de Calibração, Limite de deteção (LD) e quantificação (LQ)	47
4.3.2. Preparação dos Brancos	49

4.3.3.	Modo Operatório	51
4.3.4.	Ensaio com PAA	53
4.3.4	Quantificação do composto em estudo.....	54
4.3.5.	Ensaio Ecotoxicológico.....	55
4.3.6.	Ensaio complementar	63
4.3.6.1.	Análise de CQO	63
4.3.6.2.	Análise do pH.....	63
5.	Resultados e Discussão	65
5.1.	Curvas de Calibração, LQ e LD	65
5.2.	Ensaio em Branco.....	67
5.2.1.	Matriz da AR.....	67
5.2.2.	Comportamento do E2 na Água Residual.....	67
5.2.3.	Branco com água desmineralizada, 17 β -Estradiol e PAA	67
5.3.	Ensaio com Ácido Peracético	67
5.4.	Ensaio Ecotoxicológico.....	69
5.4.1.	Glutathione S-Transferase (GST).....	69
5.4.2.	Catalase (CAT)	71
5.4.3.	Peroxidação Lipídica.....	73
5.4.4.	Vitelogenina (VTG).....	74
5.5.	Ensaio complementar	75
5.5.1.	Análise de CQO	75
5.5.2.	Medição do pH.....	77
6.	Conclusões.....	79
7.	Desenvolvimentos futuros.....	81
8.	Bibliografia	83

Índice de Figuras

Figura 1- Principais órgãos que constituem o sistema endócrino (Fonte: Diamanti-Kandarakis et al., 2009).....	3
Figura 2 – Classificação dos Compostos Disruptores Endócrinos (Fontes: Auriol et al, 2006b; Kozłowska-Tylingo, Namieśnik, & Górecki, 2010; C. Li et al., 2017).....	5
Figura 3 – Constituição do 17β-Estradiol (Fonte: ChemDraw©)	8
Figura 4 – Principais fontes e rotas de entrada dos EDC em meio aquático (Fonte: Bolong et al., 2009)	11
Figura 5 – Resumo das principais consequências para os peixes, mamíferos aquáticos e anfíbios da sua exposição ao composto 17β-Estradiol.....	13
Figura 6 - Resumo das principais consequências para o Ser Humano da sua exposição ao 17β-Estradiol.....	14
Figura 7 – Diagrama linear de uma ETAR convencional em Portugal Continental (Carvalho et al., 2016)	16
Figura 8- Etapas de degradação do E2 por via biológica (Fonte: Hamid & Eskicioglu, 2012)...	17
Figura 9 – Tipos de AOP mais frequentemente utilizados em tratamento terciário (Fonte: (Klavarioti et al., 2009)	24
Figura 10 – Aspeto físico do ácido peracético (Fonte: da autora)	30
Figura 11 - Indústrias que mais utilizaram PAA como desinfetante, durante o ano de 2013 (Fonte: Luukkonen & Pehkonen, 2017)	32
Figura 12 – Esquematização de uma barra extrativa SBSE (Fonte: Nogueira, 2015)	37
Figura 13 – Em sistemas HPLC encontramos (a) os diversos eluentes utilizados para a fase móvel, (b) as colunas onde são feitas as leituras das matrizes, (c) o corpo do sistema e (d) o detetor por fotodíodos (Fonte: da autora).	40
Figura 14- Cronograma dos trabalhos.	44
Figura 15 – Preparação das soluções usadas para elaboração das curvas de calibração.	47
Figura 16 – Esquema representativo dos processos para preparação dos brancos necessários aos ensaios.....	50
Figura 17 - Esquema da realização do método de extração dos compostos (adaptado de Vicente, 2016).	52
Figura 18 - Condições de funcionamento do HPLC (Fonte: da autora).....	53
Figura 19 – Foto de um peixe zebra (Fonte: The Zebrafish Lab, 2017)	55

Figura 20 – Distribuição dos tanques onde ocorreu a primeira fase dos ensaios ecotoxicológicos (Fonte: da autora).	56
Figura 21 – Pré-tratamento das amostras: após o término do ensaio, (a) as amostras foram colocadas em pequenos eppendorfs e posteriormente (b) homogeneizadas com auxílio de um (c) homogeneizador (Fonte: da autora).	57
Figura 22 - Do lado direito (a) temos uma placa onde foram depositados os reagentes para posterior (b) leitura (Fonte: da autora).	57
Figura 23 – Representação do método de distribuição das amostras nas placas.	59
Figura 24 – Do lado direito encontra-se o (a) shaker que tem como objetivo homogeneizar a amostra e do lado direito (b) encontra-se a amostra após ser homogeneizada.....	60
Figura 25 – Curva de Calibração utilizada para cálculo das concentrações.....	65
Figura 26 - Percentagens de remoção de E2, por dosagem de PAA e por tempo de contato. .	68
Figura 27 - Concentração de GST em D.rerio após exposição a diferentes condições.	70
Figura 28 - As diferentes concentrações de Catalase para os diferentes casos de exposição. .	72
Figura 29 - Níveis de destruição celular, dados pelo indicador de Peroxidação Lipídica, em D. rerio.	73
Figura 30 - Níveis de VTG medidos, em machos e em fêmeas.	74
Figura 31 - Água desmineralizada com spike de 10 ppb de E2, para análise do tempo de saída do composto (tr = 4,22 min).....	97
Figura 32 - Água residual utilizada no estudo, sem spike de composto.	103
Figura 33 - Água residual com um spike de 50 ppb de E2, para análise da expressão do analito na matriz.....	105
Figura 34 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 1 ppb de PAA. .	107
Figura 35 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 5 ppb de PAA. .	107
Figura 36 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 10 ppb de PAA.	108
Figura 37 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 15 ppb de PAA.	108
Figura 38 - Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 1 ppb de PAA ...	109
Figura 39 - Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 5 ppb de PAA. .	109
Figura 40 - Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 15 ppb de PAA.	110

Figura 41 - Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 15 ppb de PAA.	110
Figura 42 - Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 1 ppb de PAA. ...	111
Figura 43 - Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 5 ppb de PAA. .	111
Figura 44 - Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 10 ppb de PAA.	112
Figura 45 - Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 15 ppb de PAA.	112
Figura 46 - Concentração de 1 ppb de PAA e 10 min de TC.	113
Figura 47 - Concentração de 5 ppb de PAA e 10 min TC.	113
Figura 48 - Concentração de 10 ppb de PAA e 10 min de TC.	114
Figura 49 - Concentração de 15 ppb de PAA e 10 min de TC.	114
Figura 50 - Concentração de 1 ppb de PAA e 15 min de TC.	115
Figura 51 - Concentração de 5 ppb de PAA e 15 min de TC.	115
Figura 52 - Concentração de 10 ppb de PAA e 15 min de TC.	116
Figura 53 - Concentração de 15 ppb de PAA e 15 min de TC.	116
Figura 54 - Concentração de 1 ppb de PAA e 20 min de TC.	117
Figura 55 - Concentração de 5 ppb de PAA e 20 min de TC.	117
Figura 56 - Concentração de 10 ppb de PAA e 20 min de TC.	118
Figura 57 - Concentração de 15 ppb de PAA e 20 min de TC.	118

Índice de Tabelas

Tabela 1- Quantidades de estrogénios excretadas por dia, em µg/d, por diferentes grupos de indivíduos (Fonte: Barreiros et al., 2016; Bila & Dezotti, 2007; Hassani et al., 2016; Hu et al., 2003; Xu et al, 2012b).....	7
Tabela 2 – Resumo das características físico-químicas mais relevantes do composto 17β-Estradiol.....	9
Tabela 3 – Média de concentrações observadas na Europa e em particular na Ria de Aveiro em Portugal.....	12
Tabela 4 – Concentrações médias de 17β-Estradiol nos efluentes de ETAR.....	16
Tabela 5 – Eficiências de remoção dos diversos tipos de tratamento biológico.....	19
Tabela 6 - Eficiências de remoção de AOP, na remoção de 17β-Estradiol.....	26
Tabela 7- Vantagens e Desvantagens do método de extração por SBSE.....	39
Tabela 8 – Plano experimental seguido durante o período do presente trabalho.	43
Tabela 9 – Concentrações de PAA utilizadas nos ensaios.	54
Tabela 10 - Tempos de contato utilizados nos ensaios.....	54
Tabela 11 – Padrões de formaldeído utilizados para a realização da curva de calibração da CAT. Adaptado do protocolo utilizado para a determinação da enzima.....	59
Tabela 12 – Padrões de MDA utilizados para a curva de calibração para determinação da concentração para a peroxidação lipídica.....	62
Tabela 13 – Características da equação da reta, da curva de calibração.	65
Tabela 14 - Limites de deteção e quantificação.....	65
Tabela 15 – Desvio padrão obtido para cada ensaio.	68
Tabela 16 - Teste estatístico realizado, comparando as amostras em branco às concentrações GST obtidas.....	70
Tabela 17 - Teste estatístico realizado, comparando as amostras em branco às concentrações de CAT obtidas.	72
Tabela 18 - Teste estatístico realizado, comparando as amostras em branco às concentrações LIPO obtidas.....	73
Tabela 19 - Concentrações de VTG nos machos e nas fêmeas de D. rerio, antes e após o tratamento com PAA e nos diversos brancos.	74
Tabela 20 - Valores de CQO medidos antes e após o tratamento com Na ₂ CO ₃ , na água residual e na solução padrão.....	75
Tabela 21 - Valores de pH medidos consoante a concentração de PAA injetada.....	77

Tabela 22 - Valores dos padrões de proteína BSA.....	119
Tabela 23 – Resumo dos resultados obtidos no ensaio do Bradford.....	121
Tabela 24 – Total de peixes utilizados nos dois ensaios.....	123
Tabela 25 – Características dos objetos de estudo em termos de comprimento, sexo e peso.	123

Anexos

Anexo I – Especificação do Composto 17 β -Estradiol	95
Anexo II – Cromatograma do composto 17 β -Estradiol	97
Anexo III – Método de determinação da CQO.....	99
Anexo IV – Dados utilizados para a determinação da curva de calibração	101
Anexo V – Cromatograma da Água Residual sem compostos	103
Anexo VI – Cromatograma da Água Residual com <i>spike</i> de 50 ppb.....	105
Anexo VII – Cromatogramas do Branco do Ensaio 1	107
Anexo VIII – Cromatogramas do Branco do Ensaio 2	109
Anexo IX – Cromatogramas do Branco do Ensaio 3	111
Anexo X – Cromatogramas do Ensaio 1	113
Anexo XI – Cromatogramas do Ensaio 2	115
Anexo XII – Cromatogramas do Ensaio 3	117
Anexo XIII – Protocolo Bradford	119
Anexo XIV – Resultado do Bradford para os cálculos de GST, CAT e VTG	121
Anexo XV – Características dos objetos de estudo utilizados nos ensaios Ecotoxicológicos (<i>D. rerio</i>).....	123
Anexo XVI – Poster elaborado para a conferência SPECO.....	125
Anexo XVII – Confirmação da submissão para a conferencia ISDRS.....	127

1. Introdução

A crescente presença nos meios aquáticos de compostos desreguladores endócrinos (EDC) tem sido alvo da atenção por parte da comunidade científica. A principal origem para o ambiente destes compostos tem sido a descarga de efluentes de ETAR (Caliman & Gavrilescu, 2009; Richardson & Kimura, 2017). Sabe-se que estes compostos têm a capacidade de interferir com o sistema endócrino de animais e seres vivos com consequências graves para a saúde (Barreiros et al, 2016), sendo de extrema importância a sua remoção das águas residuais.

A remoção de EDC através de tratamentos biológicos pode ser por vezes insuficiente, recorrendo-se ao tratamento terciário para eliminação completa destes compostos, ou respetivos subprodutos. A adição de cloro, sendo um dos principais desinfetantes usados em água e água residual, tem sido uma das possibilidades com essa função. No entanto, a reação deste oxidante com a matéria orgânica presente em água residuais, poderá conduzir a situações de formação de subprodutos que são considerados tóxicos, nomeadamente trihalometanos (Luo *et al.*, 2014).

Neste sentido, torna-se importante estudar uma alternativa ao cloro, que consiga remover estes compostos de forma igualmente eficaz, mas sem a possibilidade de formação de subprodutos perigosos e/ou tóxicos.

1.1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo o estudo da remoção de 17β -estradiol através da adição de Ácido Peracético. Paralelamente, avaliaram-se os possíveis efeitos ecotoxicológicos deste oxidante.

1.2. Estrutura da Tese

O presente trabalho encontra-se dividido em 8 capítulos, no qual o último é dedicado a referências bibliográficas.

Ao longo do capítulo 2 abordou-se o estado da arte sobre a presença dos EDC em ambientes aquáticos e os seus possíveis efeitos nos organismos, e em particular, do 17β -Estradiol. A sua origem, as principais origens de contaminação e os métodos convencionais da sua remoção em ETAR, foram igualmente alvo de estudo.

Ainda no capítulo 2, discutiu-se o papel da desinfecção de águas residuais, e equacionou-se o Ácido Peracético como alternativa ao cloro, onde foi dada uma breve contextualização. Foram também abordados os métodos de extração e deteção utilizados na presente dissertação.

No capítulo 3 e 4 apresentou-se o plano experimental, os materiais utilizados e os métodos seguidos.

No capítulo 5 foram apresentados os resultados e a respetiva discussão. Finalmente, no capítulo 6 apresentaram-se as principais conclusões e no capítulo 7 um conjunto de sugestões para desenvolvimentos futuros.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Sistema Endócrino

O sistema endócrino pode ser descrito como um sistema constituído por um conjunto de órgãos que produzem mensageiros químicos, denominados por hormonas, que regulam diversas funções do corpo (Hodgson, 2004). Este sistema é frequentemente denominado de sistema neuroendócrino, por se encontrar intimamente ligado ao sistema nervoso, uma vez que este último é capaz de regular a função endócrina, e vice-versa (Kovacs J. & Ojeda R., 2011).

Este sistema é composto por diversos órgãos e glândulas, que produzem hormonas diferentes com funções distintas. Estas são responsáveis pela regulação e manutenção do sistema reprodutivo, produção de energia e metabolismo (Hodgson, 2004; Kovacs J. & Ojeda R., 2011).

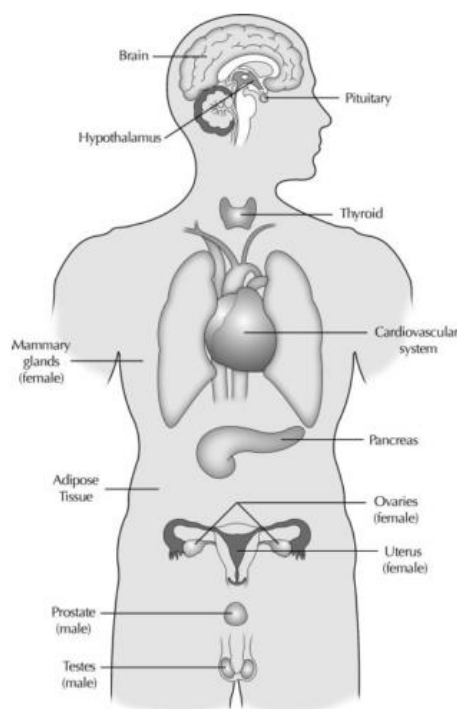


Figura 1- Principais órgãos que constituem o sistema endócrino (Fonte: Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Entre os inúmeros grupos hormonais produzidos pelo sistema endócrino, encontram-se os androgénios (onde se inclui a testosterona) e os estrogénios (onde se inclui o 17 β -estradiol). O primeiro é produzido nos testículos e nas glândulas supra-renais e o segundo é produzido nos ovários e testículos. São hormonas responsáveis pela diferenciação sexual, fertilidade, características sexuais secundárias, bem como a função sexual e libido do homem e da mulher (Hodgson, 2004).

A produção hormonal inicia-se no sistema nervoso central, mais especificamente no hipotálamo, e é geralmente induzida por um fator externo, como temperatura, odores ou estímulos visuais. As hormonas são depois enviadas pela corrente sanguínea até aos respetivos recetores, localizados nas membranas celulares. Após a ligação hormona-recetor, existe a síntese de novas proteínas que irá controlar a função dos órgãos e tecidos, quer em ser vivos quer no Homem, respondendo aos estímulos que lhes deram origem (Bergman *et al.*, 2013; Hodgson, 2004).

Os disruptores endócrinos vão interferir com os recetores hormonais, uma vez que estes têm estruturas semelhantes às hormonas naturais, podendo ainda simular, estimular ou inibir o sistema endócrino, levando a um excesso ou défice de hormonas (Bergman *et al.*, 2013; Diegues & Martins, 2010). Estes compostos podem atuar de duas diferentes formas produzindo diferentes respostas como consequência: podem funcionar como agonistas, ou seja, quando se ligam ao recetor hormonal, ativam-no e produzem estímulos que podem resultar em expressões erradas, tais como o desenvolvimento de seios nos homens; ou como antagonistas, inibindo a ação e a síntese de proteínas, resultando, por exemplo, na feminização de machos no caso da fauna aquática (Bergman *et al.*, 2013; Hodgson, 2004).

2.2. Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC)

Endocrine disrupting compounds ou compostos desreguladores endócrinos podem ser definidos como “compostos químicos capazes de interferir com a função do sistema endócrino, dos seres vivos, incluindo o Homem, afetando a sua síntese ou metabolismo com conseqüente alteração dos níveis dos recetores hormonais” (Barreiros *et al.*, 2016). São substâncias consideradas dominantes, e dispersam com rapidez no ambiente. As principais bacias de retenção para estes compostos são águas subterrâneas, rios e lagos (Auriol *et al.*, 2006).

Os EDC podem ser classificados em (figura 2):

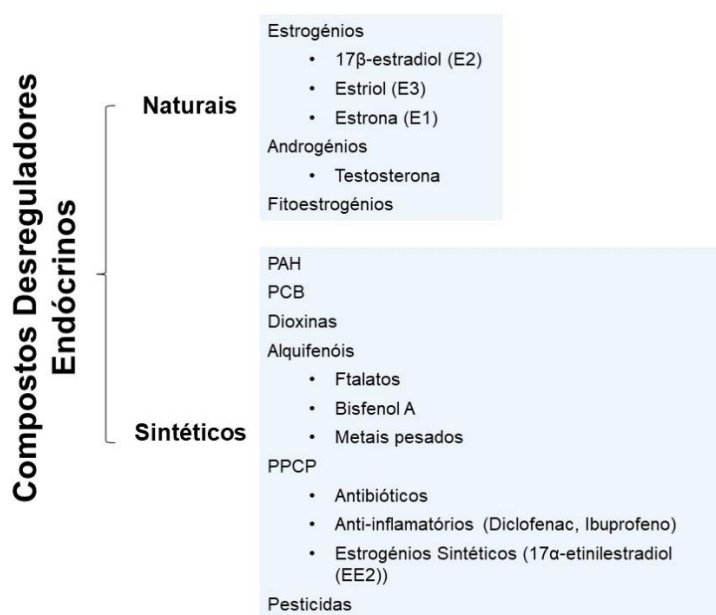


Figura 2 – Classificação dos Compostos Disruptores Endócrinos (Fontes: Auriol *et al.*, 2006b; Kozłowska-Tylingo, Namieśnik, & Górecki, 2010; C. Li *et al.*, 2017)

Na UE, estão incluídos na lista de vigilância de substâncias emergentes devido à sua ubiquidade no ambiente, bem como ao largo número de usos de aplicação residencial, industrial e de agricultura. Em particular o E2 e EE2 têm sido alvo de uma atenção especial, devido à sua estrogénica ativa e potencial risco para os ecossistemas e vida humana (C. Li *et al.*, 2017; Schiliró *et al.*, 2009).

Atualmente as preocupações relativas à exposição a EDC são: i) a incerteza da produção de efeitos tóxicos em baixas concentrações; ii) saber quais são as substâncias que estão associadas a esses efeitos; iii) saber se a presença destes compostos apresentam concentrações ambientalmente relevantes de forma a produzir efeitos negativos na saúde humana e animal; iv) saber se existe e quais as concentrações consideradas seguras para estes compostos (Bila & Dezotti, 2007).

2.3. 17 β -Estradiol

O 17 β -Estradiol é uma das hormonas principais do sistema reprodutor feminino, e encontra-se associado à manutenção das suas características sexuais, como o crescimento dos seios ou a proliferação das células do epitélio (Barreiros *et al.*, 2016; Hassani *et al.*, 2016). A sua excreção é feita maioritariamente através da urina ou das fezes sob a forma de conjugados (Auriol *et al.*, 2006; Guedes-Alonso, Montesdeoca-Esponda, Sosa-Ferrera, & Santana-Rodríguez, 2014; Hu, Cheng, Aizawa, Terao, & Kunikane, 2003; Xu *et al.*, 2012).

A quantidade de 17 β -Estradiol libertada varia principalmente devido à grande diferença estrutural da população, das suas idades e do seu metabolismo individual bem como a diferença de etnias e género, entre outros fatores (Barreiros *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2012a). Um estudo conduzido em 1984, comparou a variação de excreção de estrogénio em diferentes mulheres de diferentes etnias, e concluiu que as mulheres nativas Chinesas libertam uma menor quantidade de estrogénio, comparativamente a mulheres Caucásicas e mulheres Americanas com descendência Chinesa. Esta diferença poderia estar relacionada com fatores culturais e estilo de vida (Xu *et al.*, 2012a).

Na tabela 1 observa-se a quantidade de estrogénio excretada por dia, por mulheres em diferentes fases do seu ciclo de reprodução e por homens.

Tabela 1- Quantidades de estrogénios excretadas por dia, em $\mu\text{g/d}$, por diferentes grupos de indivíduos (Fonte: Barreiros *et al.*, 2016; Bila & Dezotti, 2007; Hassani *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2012b).

	Urina ($\mu\text{g/d}$)	Fezes ($\mu\text{g/d}$)
Homens	1,6	-
Mulheres menstruadas	3,96	0,2
Mulheres grávidas	278,6	202
Mulheres em menopausa	2,3	-

Estruturalmente, o 17 β -Estradiol é um isômero 17 β do composto Estradiol. Trata-se de uma hormona esteróide com 18 carbonos (C18), constituída por um fenol, dois ciclo-hexanos e um ciclopentano, com grupos hidroxilo localizados no C3 e C17 (Hamid & Eskicioglu, 2012; PubChem Compound Database, 2017). Na figura 3 encontra-se representada a sua estrutura.

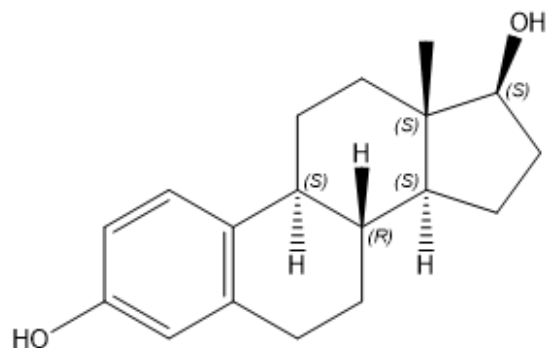


Figura 3 – Constituição do 17 β -Estradiol (Fonte: ChemDraw®)

A tabela 2 resume algumas das características físico-químicas mais importantes relativas a este composto.

Tabela 2 – Resumo das características físico-químicas mais relevantes do composto 17β-Estradiol.

	E2	Fonte
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	PubChem Compound Database, 2017
Massa molecular (g/mol)	272,4	Ben Fredj, Nobbs, Tizaoui, & Monser, 2014; Hamid & Eskicioglu, 2012; Silva, Otero, & Esteves, 2012
CAS	50-28-2	Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Hamid & Eskicioglu, 2012; European Chemicals Agency - ECHA, 2017
Solubilidade em água (mg/L a 20°C)	13	Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Silva <i>et al.</i> , 2012; Clouzot & Ce, 2008; Adeel, Song, Wang, Francis, & Yang, 2017
pK_a	10,71 10,4 10,6	Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014 Hamid & Eskicioglu, 2012 Adeel <i>et al.</i> , 2017
Log K_{ow}	3,94 4,01	Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Silva <i>et al.</i> , 2012; Carvalho <i>et al.</i> , 2016; Adeel <i>et al.</i> , 2017 Hamid & Eskicioglu, 2012
Lei de Henry (atm m³ mol⁻¹)	3,64 × 10 ⁻¹¹	Silva <i>et al.</i> , 2012

A maioria dos compostos disruptores endócrinos são apolares, hidrófobos e com valores baixos de K_{ow}. Este trata-se do coeficiente de partição octanol/água e é um indicador importante, que indica o poder de sorção que os compostos estrogênicos apresentam face à fase sólida, permitindo prever o seu comportamento em ambiente aquático. Compostos cujo coeficiente seja superior a 4, demonstram ter um potencial de sorção elevado, como é o caso do 17β-Estradiol cujo fator de partição é de 3,94/4,01, como indicado na tabela 2 (Auriol, *et al.*, 2006; Caliman & Gavrilescu, 2009; Luo *et al.*, 2014).

A solubilidade do 17β-Estradiol é considerada elevada, no entanto, este parâmetro é fortemente afetado pelo pH, temperatura e força iônica, podendo variar ao longo do tempo (Shareef *et al.*, 2006).

A constante de dissociação ácida, ou pK_a , é também um parâmetro relevante aquando a previsão do comportamento dos compostos estrogénicos em meio aquático. Trata-se de um indicador que nos permite aferir a facilidade de dissociação destes. Na maioria dos casos, as hormonas encontram-se na sua forma não ionizada, pois o seu pK_a é maior que o pH das águas residuais, que se encontram habitualmente na gama do neutro. Quando o pH aumenta e ultrapassa o valor do pK_a (≈ 10), estes compostos dissociam-se, cedendo protões à água produzindo cargas negativas. Tendo em conta que a estrutura do floco é igualmente carregada negativamente, existirá uma repulsão associada que não permite a agregação dos compostos ao floco, dificultando assim a sua decomposição pelos microrganismos, e prevalecendo na fase líquida. É então expectável que pelo seu elevado valor de pK_a , o 17 β -Estradiol tenha uma grande afinidade às partículas sólidas presentes na água residual, facilitando assim a sua degradação por via biológica (Puckowski *et al.*, 2016; Schäfer *et al.*, 2011; Urban *et al.*, 1993).

Finalmente, outro parâmetro relevante é a lei de Henry que define o poder de volatilização de um composto, através do rácio entre a quantidade de composto presente na água e no ar. O composto 17 β -Estradiol apresenta um valor da lei de Henry muito baixo, traduzindo-se em taxas de evaporação igualmente baixas, confirmando a sua presença na forma solúvel, sob condições de pressão e temperatura normais (Khanal Kumar *et al.*, 2006; Ting & Praveena, 2017).

2.4. Fontes de contaminação e principais efeitos

A entrada dos EDC em ambiente aquático pode dar-se através de duas vias distintas: por meio de fontes pontuais ou difusas.

As fontes pontuais incluem a descarga de águas residuais domésticas ou industriais, e lixiviados de aterros sanitários. A entrada com origem em fontes difusas é feita pelo *run-off* proveniente da atividade agrícola e aquacultura, e do escoamento superficial que se verifica nas estradas (Bolong *et al.*, 2009; Ting & Praveena, 2017). Ainda assim diversos estudos apontam que as fontes pontuais são as principais vias de entrada de compostos estrogénicos no ecossistema aquático (Auriol *et al.*, 2006; Bolong *et al.*, 2009; Caliman & Gavrilescu, 2009; Falconer *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2011; Prasse *et al.*, 2015; Schiliró *et al.*, 2009).

Na figura 4 mostra-se um resumo das fontes de poluição mencionadas.

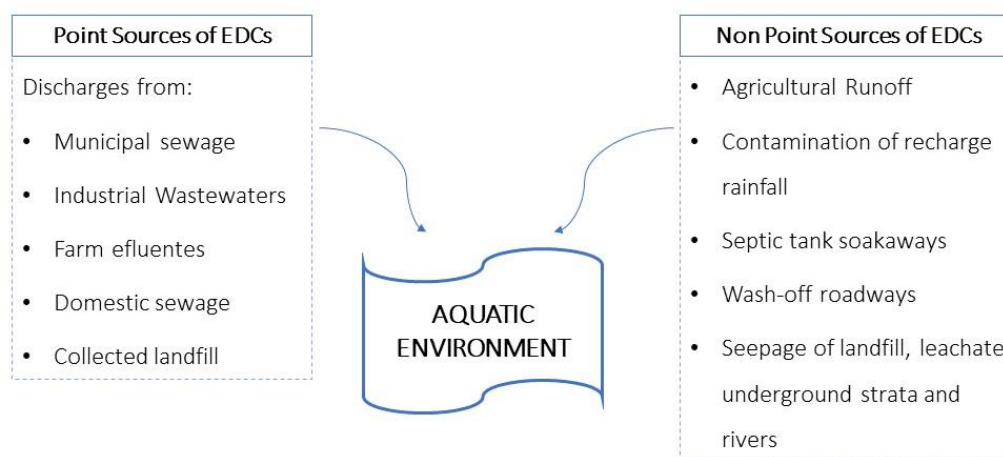


Figura 4 – Principais fontes e rotas de entrada dos EDC em meio aquático (Fonte: Bolong *et al.*, 2009)

Na categoria de poluição através de fontes difusas, inclui-se o *run-off* gerado pela indústria pecuária ou pela aquacultura sendo estas as fontes predominantes de entrada de estrogénios em meio aquático (Adeel *et al.*, 2017; Caliman & Gavrilescu, 2009; Ting & Praveena, 2017). Relativamente à indústria pecuária, as fontes mais relevantes são a excreção de urina e estrume que contenham este tipo de substâncias. Geralmente estas funcionam como intensificadores de crescimento ou de aumento significativo da eficiência de produção de massa muscular (Adeel *et al.*, 2017; Ting & Praveena, 2017). É ainda prática comum utilizar o estrume produzido pelo gado para adubar campos agrícolas, para produção de alimentos para consumo humano. No entanto, este contém elevadas quantidades de estrogénios na sua composição. No Reino Unido, a quantidade de 17 β -Estradiol excretada, verificada em animais de quinta, foi de cerca de 570 kg/ano (Adeel *et al.*, 2017). Sabe-se igualmente, que na conversão de estrume em biogás, podem ser encontradas elevadas concentrações de 17 β -Estradiol, nomeadamente na composição do digerido. Foram registadas concentrações na ordem dos 1478 ng/g, representando assim outra fonte significativa de poluição estrogénica.

As ETAR Municipais e Industriais são das principais fontes pontuais de poluição estrogénica uma vez que a configuração destas não permite a eliminação total dos compostos (Adeel *et al.*, 2017; Auriol, Filali-meknassi, *et al.*, 2006). Atualmente, estas estão desenhadas principalmente para a remoção de fósforo, azoto e carbono e apenas uma fração dos compostos emergentes é eliminado em simultâneo, sendo que menos de 10% dos estrogénios são removidos através de tratamento biológico e pela adsorção às lamas. A restante fração segue pela linha de tratamento sob forma solúvel no efluente (Auriol, Filali-meknassi, *et al.*, 2006). Grande parte dos estrogénios encontrados em águas residuais provêm de efluentes domésticos (pela excreção de fezes e urina), efluentes hospitalares, cuja fonte de estrogénio é maioritariamente a realização de análises a urina a mulheres grávidas ou outros pacientes, e efluentes da indústria farmacêutica, com origem nos subprodutos gerados ou intermediários da produção de pilulas contraceptivas (Ting & Praveena, 2017).

As concentrações de estrogénios encontradas a jusante de descargas de ETAR estão na ordem dos ng/L-µg/L, ou seja, concentrações muito baixas que por vezes não conseguem ser detetadas (Bolong *et al.*, 2009). Na tabela 3 encontram-se, resumidas, as concentrações médias observadas nos efluentes de ETAR em Portugal e na Europa.

Tabela 3 – Média de concentrações observadas na Europa e em particular na Ria de Aveiro em Portugal.

	E2 (ng/L)	Fonte
Reino Unido	7 - 88	Bolong <i>et al.</i> , 2009
Alemanha	0,9	Bolong <i>et al.</i> , 2009
Paris	4,5 – 8,2	Auriol <i>et al.</i> , 2006
Itália	1,4	Auriol <i>et al.</i> , 2006
Barcelona, Espanha	< 2,8 – 8,1	Auriol <i>et al.</i> , 2006
Ria de Aveiro, Portugal	0,8 – 9,2	Sousa <i>et al.</i> , 2010

Ainda assim, estudos demonstram que concentrações entre 0,1 e 1 ng/L são passíveis de causar efeitos nocivos nos seres vivos (C. Li *et al.*, 2017).

Na generalidade dos casos estudados, verifica-se que a jusante da descarga de efluentes municipais existe uma alteração comportamental e morfológica da fauna aquática. Estas alterações incluem alteração no desenvolvimento sexual dos peixes, mudança nos comportamentos relacionados com acasalamento (Hamid & Eskicioglu, 2012), diminuição do rácio entre machos e fêmeas (A. C. V. Dias *et al.*, 2015) devido à feminização dos machos, através da síntese de VTG, maior ocorrência de casos de hermafroditismo, morte prematura da descendência, inibição do crescimento testicular (Bila & Dezotti, 2007; Prasse *et al.*, 2015) e ainda a diminuição no sistema imunitário de mamíferos marinhos, associado à exposição continua a estes compostos (Bila & Dezotti, 2007; Boshir *et al.*, 2017).

Estudos previamente efetuados demonstraram ainda que ocorreram alterações da função endócrina reprodutiva em peixes, devido ao contato permanente com efluentes domésticos e industriais (Bolong *et al.*, 2009). Nos anfíbios os efeitos causados pela exposição a compostos estrogênicos não foram significativos, ainda que se tenha verificado um atraso na metamorfose destes, o que pode causar distúrbios no seu desenvolvimento e reprodução (Matthiessen, Wheeler, & Weltje, 2017).

A figura 5 resume todos os efeitos conhecidos relevantes observados em cada espécie.

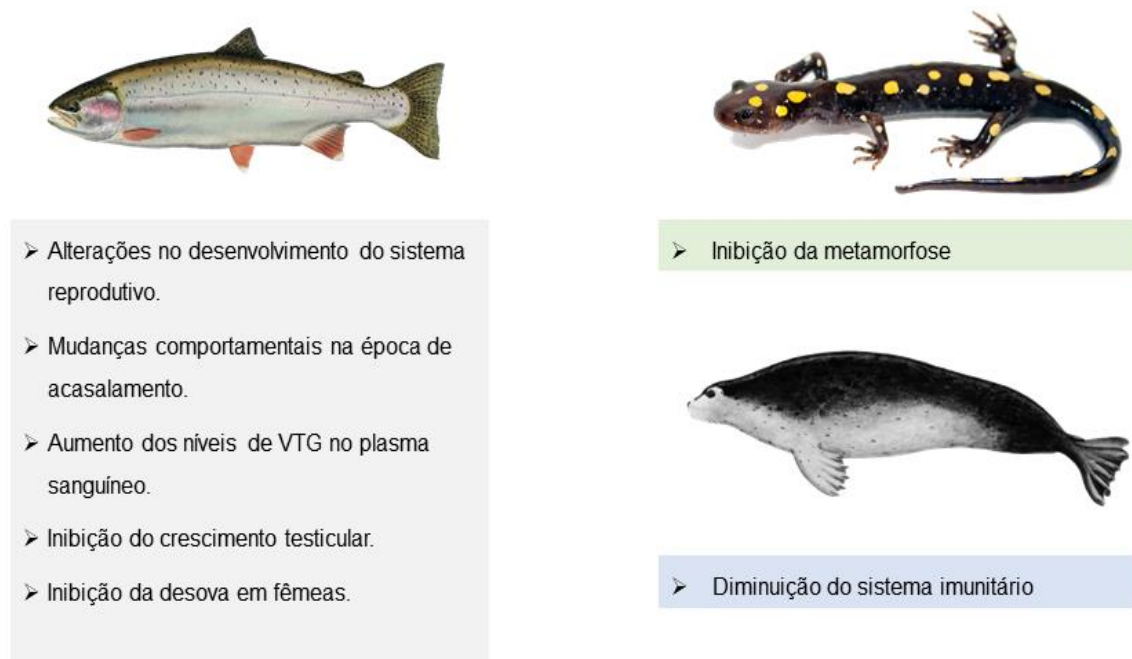


Figura 5 – Resumo das principais consequências para os peixes, mamíferos aquáticos e anfíbios da sua exposição ao composto 17β-Estradiol.

Para o Homem existem igualmente inúmeros riscos, maioritariamente devido ao consumo de espécies com estrogénios presentes no seu organismo, mas também pelo consumo de água com compostos, através do mecanismo de bioacumulação (Nollet & Lambropoulo, 2017).

Ainda que os efeitos do consumo de compostos com disrupção endócrina na saúde Humana seja um tópico pouco aprofundado, já existem alguns estudos nos quais se verificam efeitos adversos na saúde de mulheres grávidas ou doentes oncológicos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Manibusan & Touart, 2017; Mehmet Uzumcu, 2016; Patel *et al.*, 2015; Timms *et al.*, 2005). Sabe-se também que, de uma forma geral, a disrupção endócrina no Homem pode levar à infertilidade, mal formações do sistema reprodutivo, défice de atenção ou hiperatividade, alterações no funcionamento da tiróide (Bolong *et al.*, 2009; Caliman & Gavrilescu, 2009), acréscimo na incidência de diversos cancros como o da mama, ovários e próstata (Adeel *et al.*, 2017; Bolong *et al.*, 2009), diminuição da quantidade de esperma e aumento testicular (Bolong *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011). Verifica-se igualmente a ocorrência de doenças como criptorquia – caracterizada pela não descida dos testículos -, e hipospádia – caracterizada pela mal formação do trato urogenital (Nollet & Lambropoulo, 2017). Nas últimas décadas, a tendência para a puberdade precoce em jovens adolescentes tem vindo a aumentar, tanto na Europa como nos Estados Unidos (Nollet & Lambropoulo, 2017).

Na figura 6 mostra-se um resumo de todos os efeitos adversos causados pelos EDC, quer para o homem, quer para a mulher.

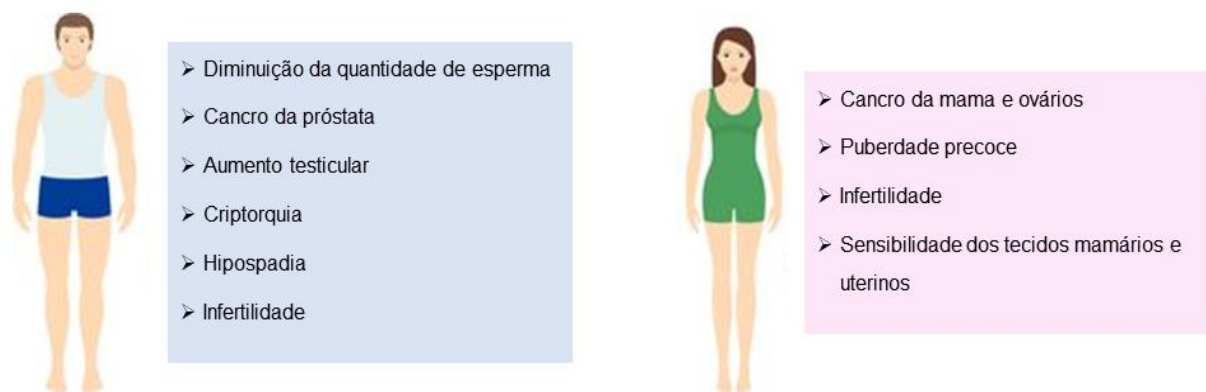


Figura 6 - Resumo das principais consequências para o Ser Humano da sua exposição ao 17 β -Estradiol.

2.5. Remoção de 17 β -Estradiol em sistemas de tratamento de água residual

A remoção de compostos disruptores endócrinos tem-se revelado cada vez mais um desafio, uma vez que estes chegam às ETAR a concentrações muito baixas (Tabela 4), sendo igualmente difícil a sua determinação (Bolong *et al.*, 2009). As ETAR convencionais estão projetadas principalmente para a remoção de carbono, fósforo e azoto, sendo que pode eventualmente haver alguma remoção de compostos estrogénicos (Hamid & Eskicioglu, 2012).

Existem diversos estudos que demonstram que existem remoções superiores a 98%, contudo, noutros estudos semelhantes verificou-se apenas remoções de 61% dos compostos presentes nos afluentes, comprovando a existência uma grande variabilidade na eficiência de remoção deste tipo de compostos (Hamid & Eskicioglu, 2012).

Luo *et al.* (2014) compilaram uma série de estudos sobre remoção de fármacos em ETAR, e concluíram que a média de remoção do composto 17 β -Estradiol era de 98,2 % \pm 3,2%. Em contraste, Carballa *et al.* (2004) verificaram uma remoção geral de apenas 65% e Tarpani & Azapagic (2018) de 80%.

A falta de consenso na comunidade científica em relação à eficiência de remoção deste tipo de compostos pode ser explicada pelas diferentes condições experimentais de cada autor. Atualmente sabe-se também que a *performance* das ETAR na remoção de EDC pode variar consoante a estação do ano, a quantidade de caudal que aflui à estação bem como a sua constituição, parâmetros operacionais da própria ETAR e sequência de tratamentos utilizados (Liu *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2017).

Tabela 4 – Concentrações médias de 17 β -Estradiol nos efluentes de ETAR.

Localização	Concentração (ng/L)	Fonte
Lisboa, Portugal	1,12 ⁽¹⁾	Mario S. Diniz <i>et al.</i> , 2010
Reino Unido	7-88	Bolong <i>et al.</i> , 2009
	<0,3	Auriol <i>et al.</i> , 2006
Alemanha	0,9	Bolong <i>et al.</i> , 2009
	22,7	Auriol <i>et al.</i> , 2006
Paris, França	11,1-17,6	Auriol <i>et al.</i> , 2006
Barcelona, Espanha	< 5 – 30,4	Auriol <i>et al.</i> , 2006
Galiza, Espanha	2 -3	Carballa <i>et al.</i> , 2004
Itália	10-31	Maia & Dezotti, 2007
Suécia	3	Tarpani & Azapagic, 2018
Japão	2,7-48	Bolong <i>et al.</i> , 2009
Irão	1,02-8,00	Mohagheghian <i>et al.</i> , 2014
Austrália	229 \pm 64	Zhang <i>et al.</i> , 2011

⁽¹⁾ Leitura feita através do método ELISA. Valor retirado do ponto número 1 de amostragem.

Em Portugal, uma ETAR convencional poderá incluir as etapas de pré-tratamento, tratamento primário, secundário e terciário, ilustrado na figura 7 (Carvalho *et al.*, 2016).

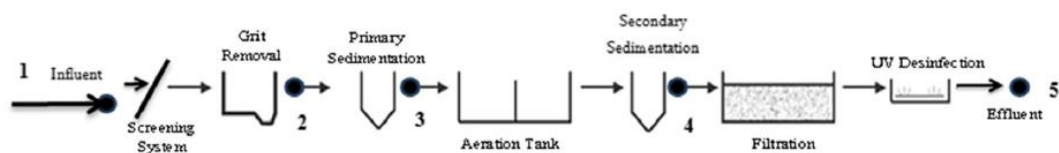


Figura 7 – Diagrama linear de uma ETAR convencional em Portugal Continental (Carvalho *et al.*, 2016)

- **Pré-Tratamento e Tratamento Primário**

Na fase de pré-tratamento não existem remoções significativas de EDC (Koh *et al.*, 2008). No entanto, através da remoção de óleos e gorduras, verifica-se alguma remoção de E2, uma vez que este tem um grande poder de adsorção a substâncias lipofílicas (Koh *et al.*, 2008).

No tratamento primário existe remoção associada à adsorção a lamas e respectivos processos de sedimentação ou floculação. Nesta etapa, o mecanismo de remoção mais significativo é o de adsorção (Hamid & Eskicioglu, 2012; Ting & Praveena, 2017).

Ainda assim, o grau de remoção depende de diversos fatores como a hidrofobicidade dos compostos, conteúdo de sólidos suspensos, tempos de retenção, entre outros (Hamid & Eskicioglu, 2012; Koh *et al.*, 2008), podendo variar significativamente. As percentagens de remoção mais comuns para estes compostos, na fase inicial de tratamento, encontra-se entre 0,19 e 49% (Luo, Guo, Ngo, *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2012a)

- **Tratamento Secundário**

O tratamento secundário é considerado crucial na remoção de compostos estrogénicos. Apesar do mecanismo de adsorção ter uma importância significativa, acredita-se que nesta fase os processos de biodegradação e biotransformação são os responsáveis pela eliminação quase completa destes compostos em águas residuais (Koh *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012; Ting & Praveena, 2017). Muitos dos microrganismos presentes em processos como o de lamas activadas, utilizam este tipo de compostos como a sua principal fonte de carbono para obtenção de energia (Koh *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012).

O composto 17 β -Estradiol é degradado através de enzimas e bactérias capazes de transformar E2 em E1, que é posteriormente oxidado. A figura 8 mostra a conversão descrita anteriormente.

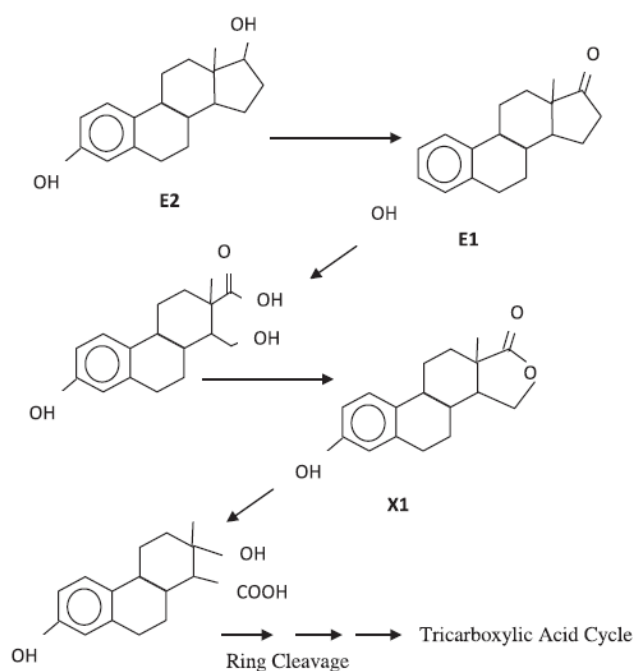


Figura 8- Etapas de degradação do E2 por via biológica (Fonte: Hamid & Eskicioglu, 2012)

A escolha do processo biológico influencia a capacidade de biodegradação destas hormonas e a sua consequente eficiência de remoção. Dentro dos sistemas de tratamento biológico estão incluídos os sistemas de biomassa suspensa, que inclui tratamento por lamas activadas, ou sistemas de biomassa fixa, que incluem tratamentos através de leitos percoladores e discos biológicos. Dos tipos de tratamento nomeados, estudos comprovam que sistemas de biomassa suspensa são mais eficientes na remoção de estrogénios comparativamente a sistemas de biomassa fixa (Ting & Praveena, 2017).

O sistema convencional de lamas activadas é o mais utilizado em ETAR, e também o que demonstra melhores resultados em termos de remoção de compostos estrogénicos (Hamid & Eskicioglu, 2012; Silva *et al.*, 2012) em grande parte devido ao ambiente aeróbio verificado, e igualmente devido ao maior TRH e idade de lamas, comparativamente aos sistemas de biomassa fixa (Hamid & Eskicioglu, 2012; Ting & Praveena, 2017). Estes dois últimos parâmetros têm uma importância significativa no processo de remoção de compostos farmacêuticos e hormonas. Num estudo publicado por Ejhed *et al.* (2018), verificou-se a forte dependência entre os mesmos e a remoção de hormonas, como o 17 β -Estradiol. O aumento do TRH e da idade de lamas permite o crescimento de uma comunidade microbiana diversificada, aumentando assim a taxa de biodegradação deste composto.

Adicionalmente, quando um sistema de lamas activadas se encontra associado à remoção de nutrientes, o aumento destes dois parâmetros permite uma melhoria significativa da remoção de azoto, que, conseqüentemente, tem uma influência direta na eficiência de remoção de EDC, uma vez que as bactérias nitrificantes são capazes de degradar igualmente o 17 β -Estradiol (Ejhed *et al.*, 2018; Hamid & Eskicioglu, 2012; Luo, Guo, Ngo, *et al.*, 2014).

Tabela 5 – Eficiências de remoção dos diversos tipos de tratamento biológico.

Tipo de Tratamento	Local	Eficiencia de remoção (%)	Fonte
Lamas Activadas	Brasil	≈100	Ternes <i>et al.</i> , 1999
	Alemanha	64	Ternes <i>et al.</i> , 1999
	Harbin, China	69,3	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	Galiza, Espanha	65	Tiwari <i>et al.</i> , 2017
	-	85	Ejhed <i>et al.</i> , 2018
	-	80 - ≈100 ⁽¹⁾	Ifelebuegu, 2011
	-	55 – 92,1	Ting & Praveena, 2017
	-	88	Silva <i>et al.</i> , 2012
Discos biológicos	-	± 25	Ifelebuegu, 2011
	Portugal	53-86	Ribeiro, 2017
SBR	-	82	Ting & Praveena, 2017
	Canadá	83,4	Ze-hua Liu <i>et al.</i> , 2015
MBR	-	82 - ≈100 ⁽¹⁾	Boshir <i>et al.</i> , 2017
	-	80 - ≈100 ⁽¹⁾	Clara <i>et al.</i> , 2005
	-	> 90 ⁽¹⁾⁽²⁾	Koh <i>et al.</i> , 2008
Leitos Percoladores	-	33,6-74,8	Ting & Praveena, 2017
	-	54	Ejhed <i>et al.</i> , 2018
Vala de Oxidação	-	60-70	Ifelebuegu, 2011
	-	83,4-99	Ting & Praveena, 2017
Biofiltros	-	40-50	Ifelebuegu, 2011
Lagoas arejadas	-	30-99	Ting & Praveena, 2017
	Canadá	80-98	Servos <i>et al.</i> , 2005

⁽¹⁾ Inclui processos de Nitrificação/Desnitrificação.

⁽²⁾ STR de 12 a 15 dias.

Em alternativa ao sistema convencional de lamas ativadas, pode-se igualmente utilizar o sistema MBR (Reator Biológico de Membranas). Este funciona como um complemento ou substituto do tratamento secundário convencional, e é caracterizado por ter um elevado STR, e menor HRT. Este sistema integra a degradação biológica com a filtração por membranas, resultando num efluente de elevada qualidade (Boshir *et al.*, 2017; Metcalf & Eddy, 2003).

A eliminação de EDC advém da capacidade que este sistema tem de: reter lamas, às quais os compostos apresentam uma elevada afinidade; à capacidade que as membranas têm de intercetar compostos que apresentem hidrofobicidade moderada, ficando retidos na fase sólida destas; e finalmente, o elevado STR que promove o crescimento de população microbiana diversificada, onde se incluem organismos de crescimento lento, que são capazes de degradar compostos orgânicos complexos (Auriol *et al.*, 2006; Boshir *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2014).

No entanto este sistema apresenta algumas desvantagens, tais como, o seu elevado custo de capital, elevados custos energéticos, problemas relacionados com colmatção das membranas, elevados custos de substituição de módulos membranares e falhas operacionais. Por outro lado, o processo de remoção de estrogénios ainda se encontra na fase de evolução, pelo que as condições ótimas de operação para remoção destes compostos ainda não está totalmente definida (Boshir *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2008; Metcalf & Eddy *et al.*, 2003).

A tabela 5 apresenta as eficiências de remoção do composto E2 relacionadas com os diferentes tipos de tratamento secundário. Ainda assim, é importante ressaltar que os valores indicados podem variar consoante as condições operacionais de cada ETAR para cada tipo de tratamento (Tiwari *et al.*, 2017). Normalmente as condições experimentais diferem, como já foi anteriormente referido, e a cinética de remoção é afetada por parâmetros como o tamanho das partículas sólidas, TOC, pH, temperatura, condutividade, salinidade, competição com outros compostos que possam existir na matriz da água residual, e ainda a presença ou ausência do processo de nitrificação/desnitrificação (Silva *et al.*, 2012).

- **Tratamento Terciário**

O tratamento terciário consiste na última etapa de tratamento e poderá estar incluída uma etapa de desinfecção. O seu objetivo é o de melhoria do efluente secundário, para que consiga ir de encontro aos parâmetros de descarga estabelecidos pela legislação. É também nesta etapa que muitos dos EDC são removidos, quer seja por métodos convencionais de desinfecção ou AOP (ponto 2.6.2), quer seja através de processos multibarreira (Metcalf & Eddy *et al.*, 2003). Dentro destes últimos destacam-se a Nanofiltração (NF) e Osmose Inversa (OI). Por vezes a Ultrafiltração (UF) e Microfiltração (MF) também são utilizados, no entanto, não produzem os mesmos resultados que os dois anteriores. Por si só, tanto a MF como UF não conseguem remover compostos orgânicos complexos. No entanto, em conjunto com NF ou IO chegam a atingir eficiências entre 65-95% (Luo *et al.*, 2014).

Contrariamente, na NF e IO conseguem-se atingir bons resultados, com eficiências de remoção elevadas. Existem evidências que as taxas de remoção são mais elevadas quando na presença de ácidos húmicos, uma vez que permite a ocorrência de processos de adsorção de compostos recalcitrantes, formando complexos macromoleculares, e facilitando a sua retenção na membrana. As eficiências de remoção verificadas neste caso foram de cerca de 90% (Prasse *et al.*, 2015).

Os parâmetros que influenciam a rejeição destes compostos são: natureza físico-química dos compostos (peso molecular, tamanho molecular, pK_a , K_{ow}), características intrínsecas às membranas, e características da água residual a tratar (dureza, pH, força iónica e quantidade de matéria orgânica presente). Por isso, tal como no tratamento secundário, as eficiências de remoção de compostos, como o 17β -Estradiol, variam consoante o tipo de membrana e os parâmetros operacionais utilizados. Os valores atingidos situam-se entre os 10 e os 99% (Ze hua Liu *et al.*, 2009; Prasse *et al.*, 2015).

As maiores desvantagens que este tipo de tratamento apresenta são elevados consumos de energia e de substituição das membranas, ocorrência frequente de colmatção, tratamento adicional do rejeitado, que se traduz em elevados custos de exploração (Boshir *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2008; Wintgens, Gallenkemper, & Melin, 2002).

2.6. Desinfecção em Águas Residuais

2.6.1. Importância da desinfecção

Apesar da melhoria contínua da qualidade das massas de água, da água para consumo e das condições básicas de saneamento em países desenvolvidos, este bem continua a ser um vetor importante de transmissão de doenças infecciosas como diarreia e gastroenterite, principalmente em países em desenvolvimento (Efstratiou *et al.*, 2017)

Estima-se que, entre 1991 e 2008, cerca de 11% dos casos de infeções originadas pelo consumo de água, tenham sido causadas por parasitas, resultando em 1,7 mil milhões de casos de diarreia e provocando 842 000 mortes, especialmente em crianças com idades inferior a 5 anos (ECDC, 2011; Efstratiou *et al.*, 2017; X.-F. Li & Mitch, 2017).

O relatório *Progress on Sanitation and Drinking Water 2015* elaborado pela UNICEF em colaboração com a Organização Mundial de Saúde evidencia que em 2015 2,4 milhões de pessoas ainda não tinham acesso a instalações sanitárias, sendo que 13% defecava ao ar livre, causando problemas a nível de saneamento básico e saúde pública. Relativamente a água para consumo, ainda que se tenha verificado melhorias no tratamento e distribuição de água, 663 milhões de pessoas ainda não consomem água de fontes seguras e tratadas adequadamente.

A nível nacional sabe-se que em 2015, 95% da população é servida por uma rede pública de abastecimento de água e que, em meio urbano, 99% é fisicamente acessível e em meio rural a acessibilidade desce para 90%. Em termos de saneamento, 81% da população global nacional tem acessibilidade aos serviços de saneamento. No entanto, é importante referir que 5% da população portuguesa não beneficia de serviço público de abastecimento (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015)

Assim, a desinfecção toma um papel de extrema importância no combate contra a propagação de doenças como criptosporidiose e giardíase que prevalecem e continuam a ser as principais causas de infeção gastrointestinal na Europa (ECDC, 2011). Esta é uma operação incluída no processo de tratamento de águas e águas residuais, e tem como objetivo a inativação de microrganismos patogénicos. Trata-se de um processo obrigatório antes do uso de água residual para irrigação de culturas, recarregamento de aquíferos e descarga de águas residuais quer em solos, quer em grandes massas de água (da Costa *et al.*, 2014).

Em particular, no caso de Compostos Disruptores Endócrinos, a importância da desinfecção é redobrada uma vez que é nesta etapa que estes são removidos na sua maioria, ou até mesmo por completo (Caliman & Gavrilescu, 2009). A degradação de compostos como 17 β -estradiol é feita através do mecanismo de oxidação química, e existem inúmeros tipos e combinações de reagentes químicos aptos para desinfecção de águas residuais com remoção simultânea de EDC, denominados de Processos Avançados de Oxidação (AOP). Estes incluem ozonização, cloração, desinfecção através de raios UV, dióxido de titânio (TiO₂), fotocatalise ou junções destes processos (Ahmed *et al.*, 2017; Coleman *et al.*, 2007; Shannon *et al.*, 2008), que mineralizam estes poluentes através de reações de oxidação-redução, convertendo-os em CO₂ ou em outros metabolitos com índice de estrogenicidade menor (Ze hua Liu *et al.*, 2009).

2.6.2. *Desinfecção de Água Residual*

- **Cloro**

O cloro (Cl) é um dos oxidantes mais utilizados em contexto de desinfecção de águas residuais, revelando-se eficaz na remoção de compostos com potencial estrogénico e que garante eficiências de remoção na ordem dos 83-100%. Estudos indicam que com uma concentração inicial de E2 de 100 ng/L, uma dose de cloro de 2 mg/L e um tempo de contato de 30 min são suficientes para baixar a concentração abaixo dos limites de deteção de 30 ng/L (Ahmed *et al.*, 2017; Freese & Nozaic, 2004; Pereira *et al.*, 2011; Prasse *et al.*, 2015). O cloro pode ser utilizado numa das suas três formas: ClO₂, NaClO ou Cloro gasoso (Freese & Nozaic, 2004; Pereira *et al.*, 2011), sendo preferencialmente produzido *in situ*.

Trata-se de um reagente de fácil manuseamento, com custos de investimento e manutenção igualmente baixos, de doseamento e controlo simples, e que garante sempre residual à água tratada (Freese & Nozaic, 2004).

Ainda assim, apesar da desinfecção com cloro demonstrar diversas vantagens, a maior desvantagem que este oxidante apresenta é a formação de subprodutos tóxicos, designados de Trihalometanos (THM). Os THM formam-se quando o cloro reage com matéria orgânica que poderá ainda estar presente no final da linha de tratamento de água residual. Os quatro tipos de trihalometanos formados, considerados mais comuns, são: Clorofórmio, Bromodiclorometano, Dibromoclorometano e Brofórmio (Du *et al.*, 2017; Freese & Nozaic, 2004). Além da formação de THM, que são considerados tóxicos e com potencial mutagénico e carcinogénico (Du *et al.*, 2017), o cloro quando entra em contacto com E2, degrada-o e pode formar subprodutos deste composto com um potencial estrogénico semelhante ao original, o que é considerado um risco aquando a descarga para o meio recetor (M. Li *et al.*, 2016).

Assim, a comunidade científica tem procurado alternativas para este oxidante, de modo a que possa haver desinfecção e remoção de compostos emergentes da água, sem que haja a formação de subprodutos tóxicos quer para os organismos do meio recetor, quer para o Homem (Du *et al.*, 2017).

- **Ozono**

Apesar da utilização do Cloro ser mais comum em termos de desinfecção e remoção de EDC de águas residuais, o Ozono (O₃) também demonstrou ser uma opção viável para este efeito. Estudos efetuados provam que a eficiência de remoção, aquando a utilização de O₃, varia entre 94-99% (Pereira *et al.*, 2011).

Em termos de *performance* na desinfecção, o ozono é comparável ao cloro. No entanto, para remoção de compostos estrogênicos e farmacêuticos, o primeiro demonstrou ter uma eficiência superior. Estudos efetuados à escala piloto mostram que com uma dosagem de 5 ng/L de ozono, a um tempo de contato de 18 minutos, este oxidante teve a capacidade reduzir uma concentração de 15 ng/L de estrona (E1) para 3 ng/L – muito abaixo do LD (Caliman & Gavrilescu, 2009). Porém, como todos os outros oxidantes, também o ozono apresenta desvantagens. A primeira, e mais evidente, é o seu elevado custo de investimento e o facto de ter que ser produzido *in situ* por operadores qualificados para o efeito (Freese & Nozaic, 2004). Adicionalmente, o ozono pode ainda produzir subprodutos da desinfecção como aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos ou bromatos (BrO_3^-) quando existe a presença de brometo (Br^-) na água residual (Freese & Nozaic, 2004), que também apresentam características carcinogénicas (Gomes *et al.*, 2017).

- **Processos Avançados de Oxidação (AOP)**

Advanced Oxidation Processes (AOP) ou processos avançados de oxidação, são um conjunto de métodos oxidativos, capazes de degradar uma variedade de compostos emergentes através da sua oxidação por meio de radicais hidroxilo (OH^\cdot) (Fast *et al.*, 2017).

Estes métodos têm vindo a ser alvo de estudos cada vez mais frequentes devido à diversidade de processos envolvidos bem como às suas áreas de potencial aplicação. Dos AOP existentes, os mais comumente utilizados são fotocatalise homogénea e heterogénea baseada em radiação ultravioleta (UV) ou radiação solar visível, eletrólise, ozonização, Fenton, ultrassons e oxidação húmida. A figura seguinte mostra quais são os AOP mais utilizados para a degradação de compostos farmacêuticos (Klavarioti *et al.*, 2009).

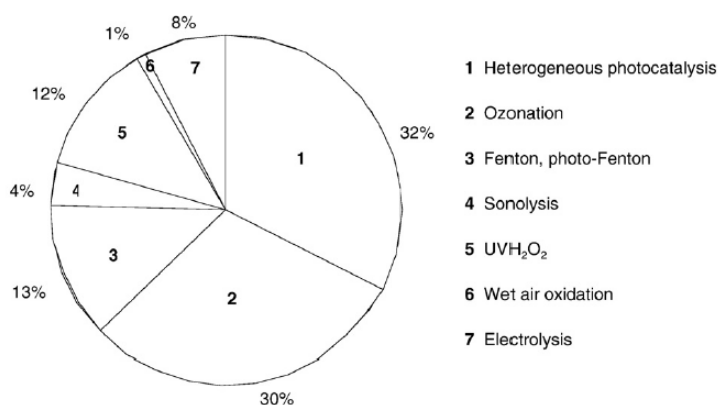


Figura 9 – Tipos de AOP mais frequentemente utilizados em tratamento terciário (Fonte: (Klavarioti *et al.*, 2009))

Muitos destes AOP podem ser utilizados individualmente ou em conjunto com outros tratamentos físico-químicos e biológicos, já que a junção destes dois tipos de tratamento pode ser benéfica em termos de eficiência de desinfecção e do próprio tratamento em geral (Klavarioti *et al.*, 2009).

Como já foi referido anteriormente, o princípio de funcionamento dos AOP é baseado na formação de OH^\cdot que reage com os poluentes orgânicos, simplificando a sua estrutura química. Uma vez que estes radicais são espécies não seletivas, são capazes de atuar sob um amplo grupo de compostos farmacêuticos orgânicos. Os EDC mais estudados incluem, entre outros, diclofenac, carbamazepina, paracetamol, penicilina, ibuprofeno, 17β -Estradiol e 17α -Ethinilestradiol (Cesaro & Belgiorno, 2015; Klavarioti *et al.*, 2009).

Apesar dos diversos estudos publicados sobre este tipo de processos oxidativos em água residual e de abastecimento, a maior parte utiliza como matriz água residual sintética, existindo ainda um certo desconhecimento sobre a atuação dos AOP em água residual real (Klavarioti *et al.*, 2009).

Mais recentemente, foi descoberto o poder oxidativo da combinação de Ácido Peracético (PAA) com raios UV, constatando-se a produção de efeitos sinérgicos aquando o processo de desinfecção de água residual. Neste caso, os raios UV quebram a ligação O-O existente na composição do PAA, formando os grupos hidroxilo, e permitindo a oxidação de compostos, bem como a inativação de microrganismos (Cai *et al.*, 2017; De Souza *et al.*, 2015).

A tabela 6 resume os tipos de AOP mais utilizados, bem como as eficiências de remoção para o composto em estudo no presente trabalho, 17β -Estradiol. No caso do processo UV/PAA o exemplo dado será de um outro composto emergente, uma vez que a remoção do 17β -Estradiol utilizando este oxidante ainda não terá sido estudada.

Tabela 6 - Eficiências de remoção de AOP, na remoção de 17 β -Estradiol.

AOP	Concentração do composto	Condições	Eficiência de remoção (%)	Fonte
O₃ e O₃/UV (baixa pressão)	C = 0,4 mM	Acetonitrilo: água, na proporção 30:70 + Água destilada	Utilizando apenas O ₃ a degradação dos compostos é satisfatória, no entanto, quando combinado com UV a degradação aumenta	
TiO₂/UVA	C = 0,05 – 3 μ M	Água destilada	50% de remoção após 10 min de tempo de contato, e eliminação da atividade estrogénica após 60 min.	Klavarioti <i>et al.</i> , 2009
TiO₂/UV (300-400 nm)	C = 0,05 – 3 μ M	Acetonitrilo/água	98% após 210 min	
O₃/H₂O₂	C = 3 ng/L	Efluente secundário	> 83% após 5 min	Gerrity <i>et al.</i> , 2011
PAA/UV	NA	C _{PAA} = 1 mg/L	> 93,5% após 2 h	Cai <i>et al.</i> , 2017
Sonólise	Mistura de estrogénios C = 10 μ g/L	NA	80-90% após 40-60 min	Cesaro & Belgiorno, 2015
Fenton	NA	H ₂ O ₂ /Fe, com várias concentrações de ferro	Remoções de 95% na generalidade dos casos	

Apesar de todas as vantagens que os AOP apresentam, a grande desvantagem é o seu custo de aplicação. A remoção de certos compostos farmacêuticos e hormonas pode tornar-se dispendioso uma vez que estes se materializam em concentrações muito pequenas, sendo necessário taxas de conversão elevadas com elevados consumos de energia (Klavarioti *et al.*, 2009). Outra grande desvantagem é a possível formação de subprodutos tóxicos para o meio recetor. AOP que incluem ozono podem formar subprodutos bromados e outros trihalometanos (Fast *et al.*, 2017).

- **Ácido Peracético**

A eficiência de desinfeção do PAA é semelhante à do ozono ou cloro, revelando-se eficaz na inativação da maioria dos microrganismos patogénicos, e remoção de coliformes totais e fecais (Luukkonen & Pehkonen, 2016).

Relativamente à remoção de microrganismos, o PAA demonstra ser maioritariamente eficaz na inativação de bactérias, seguindo-se vírus, esporos e, finalmente, cistos de protozoários, nos quais demonstra ter um poder de desinfeção menor (da Costa *et al.*, 2014; Kitis, 2004). Num estudo realizado, concluiu-se que este oxidante foi ineficaz na inativação de protozoários como *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (Kohn, T., Decrey, L., 2017; Santoro *et al.*, 2007; Wagner, Brumelis, & Gehr, 2002), dois dos microrganismos mais preocupantes em água residual e de consumo. Pelo contrário, num outro estudo realizado, os autores consideram que este oxidante é eficaz contra estes últimos microrganismos (Luukkonen & Pehkonen, 2016), observando-se alguma discórdia no seio da comunidade científica em relação a este aspeto, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre a matéria.

A redução observada de coliformes totais e fecais em efluentes terciários é bastante satisfatória, conseguindo atingir cerca de 1.000 UFC/100mL, com doses de 10 mg/L e tempos de contato de 30 min (Luukkonen & Pehkonen, 2016). Num estudo publicado em 1992, o autor recomendou uma dose entre 5-7 mg/L bem como um tempo de contato de 60 min para atingir uma concentração de coliformes totais de menos de 1000 UFC/100mL, e uma concentração de coliformes fecais de menos de 100 UFC/100mL (Santoro *et al.*, 2007).

Em termos de propriedades físico-químicas da água tratada, o PAA induz um decréscimo do pH da água residual, no entanto, este não é considerado significativo na área de dosagens tipicamente utilizadas para desinfeção. No entanto, em alguns usos industriais, onde são necessárias concentrações elevadas, pode existir um decréscimo significativo deste parâmetro. Como exemplo, uma dose de 7 mg/L de PAA reduziu o pH em 0,24 e 0,18 unidades em efluentes secundários e terciários (respetivamente), pelo contrário, um outro estudo mostrou que eram necessários mais de 60 mg/L para que o pH diminuísse em uma unidade, num efluente secundário (Luukkonen & Pehkonen, 2016; Wagner *et al.*, 2002).

A CQO e o TOC aumentam em consequência da presença de ácido acético na água. Sabe-se que, teoricamente, 5 mg/L de PAA originam cerca de 13 mg/L de ácido acético o que se traduz num aumento da CQO de 14 mg/L, pelo que é necessária alguma atenção aquando a descarga do efluente, uma vez que a Diretiva Europeia 91/271/EEC aponta para um limite deste parâmetro 125mg/L. Este aumento do conteúdo orgânico da água residual é considerado preocupante, uma vez que pode induzir o reaparecimento de microrganismos se não existir residual de PAA nos efluentes tratados (Kitis, 2004; Luukkonen & Pehkonen, 2016).

Este desinfetante mostrou-se insensível à presença de sólidos suspensos na água residual, até uma dose de cerca de 80 mg/L. Contudo, na presença de 100 mg/L de sólidos suspensos, a eficiência de desinfeção é afetada. Tal significa que quanto maior a quantidade de sólidos suspensos presentes no efluente, maior terá que ser a dosagem de ácido peracético (Santoro *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2002).

Finalmente, em termos de influência no meio recetor, em comparação com outros agentes desinfetantes, como o cloro, ozono ou UV, o ácido peracético foi o que mostrou uma toxicidade mais reduzida (da Costa *et al.*, 2014). Diversos autores investigaram a formação de subprodutos em amostras de águas residuais desinfetadas com PAA, através de ensaios *in vitro* e testes de genotoxicidade, e concluíram que doses moderadas de PAA (2 e 4 mg/L) não levam à formação de quantidades significativas de subprodutos genotóxico (Santoro *et al.*, 2007).

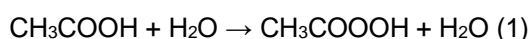
2.7. Ácido Peracético: um desinfetante emergente

2.7.1. Propriedades físico-químicas

Ácido Peracético, também designado por PAA, é um oxidante forte com um potencial de oxidação superior ao do cloro ou dióxido de cloro. É geralmente comercializado sob a forma de um equilíbrio quaternário, geralmente composto por 35% (p/p) de ácido acético, 25% (p/p) de peróxido de hidrogénio, 15% de (p/p) de ácido peracético ativo e 25% (p/p) de água (Kitis, 2004; Santoro *et al.*, 2007). Está comercialmente disponível em concentrações que variam entre os 5 e 15% (Luukkonen & Pehkonen, 2016).

Este é conhecido desde 1960 pelas suas propriedades desinfetantes, removendo vírus, fungos, bactérias e esporos (Erba, Falsanisi, Liberti, Notamicola, & Santoro, 2004; Kitis, 2004; Luukkonen & Pehkonen, 2016).

O ácido peracético pertence a categoria de peróxidos orgânicos, combinando o oxigénio ativo de um peróxido dentro de uma molécula de ácido acético. A formação natural do ácido peracético pode ser representado através da equação 1. (Kitis, 2004).



Este desinfetante pode ser sintetizado quer através da ação do peróxido de hidrogénio com o ácido acético na presença de 1% de ácido sulfúrico, quer através da oxidação de acetaldeído. O PAA puro é considerado um ácido fraco com uma constante de dissociação de 8.0 (Santoro *et al.*, 2007). O seu pH é menor que 2 (Kitis, 2004), e a sua estabilidade é menor quando o pH iguala ao seu pK_a. Em meios com pH neutro e alcalino o ácido peracético pode ser encontrado predominantemente na sua forma dissociada e não ativa, diminuindo o seu poder de desinfeção. No entanto, a pH entre 5-8 não se verificam alterações na sua capacidade desinfetante, uma vez que a hidrólise verificada é negligenciável, e a sua dissociação é causada por decomposição espontânea (Kitis, 2004; Wagner *et al.*, 2002).

Fisicamente, o PAA é um líquido transparente, sem capacidade de efervescência, que emana um odor característico forte a ácido acético (Kitis, 2004). Trata-se de um oxidante termodinamicamente instável e pode decompor-se de forma espontânea, ou explodir quando se encontra a concentrações muito elevadas, quando exposto a temperaturas altas, quando exposto a elevado stress mecânico ou quando em contacto com certas impurezas que causam efeitos catalisadores.

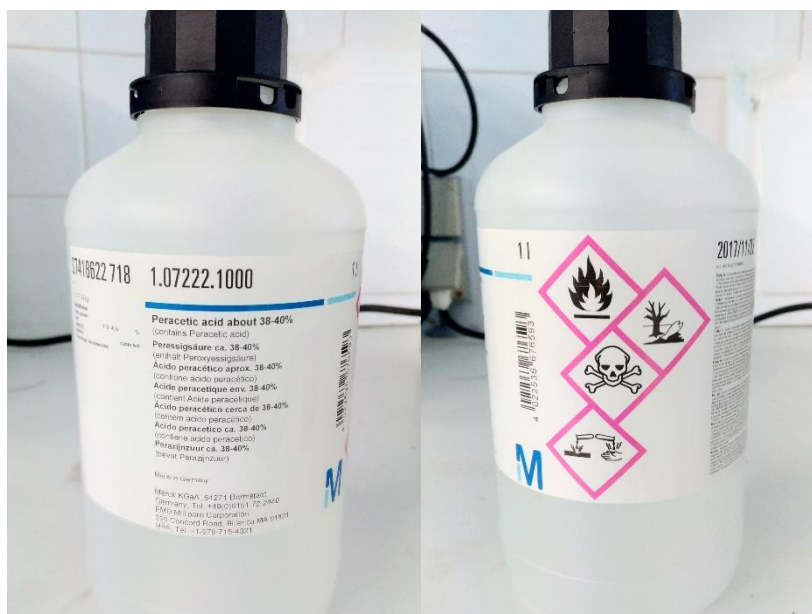


Figura 10 – Aspeto físico do ácido peracético (Fonte: da autora)

Note-se que ácido peracético a uma concentração de 40% pode perder cerca de 1 a 2% dos seus ingredientes ativos, por mês. Quando diluído a sua instabilidade aumenta, podendo perder metade do seu poder oxidativo, através de hidrólise, em 6 dias (Kitis, 2004). Por este motivo, o seu armazenamento e acondicionamento é um fator importante para prolongar a capacidade oxidativa deste ácido.

A temperatura de armazenamento recomendada é de 20°C, e deve ser mantido no seu recipiente original em ambientes ventilados. O vidro e a maior parte dos plásticos não afetam a integridade do produto (Kitis, 2004; Luukkonen & Pehkonen, 2016). No caso de ocorrerem derrames ou fugas, estas devem ser cobertas por agentes redutores fracos como o tiosulfato de sódio (Kitis, 2004).

Também no seu manuseamento é necessário ter alguns cuidados uma vez que este desinfetante pode promover a formação de tumores e é considerado carcinogénico. Em estudos prévios verificou-se que soluções de PAA a 1 e 3% promovem o desenvolvimento de tumores quando exposto em contacto direto com a pele. No entanto, tal não se verifica a médio/longo prazo quando a sua concentração é de apenas 0,3% (Kitis, 2004; Luukkonen & Pehkonen, 2016). A exposição direta ao PAA pode causar irritação e possíveis danos permanentes na pele, olhos e sistema respiratório (Luukkonen & Pehkonen, 2016).

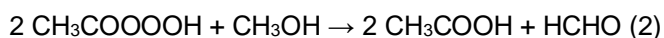
2.7.2. Subprodutos

A preocupação sobre a possibilidade de formação de subprodutos da desinfecção começou em 1970 após a descoberta de trihalometanos em águas de abastecimento público, consequência do uso de cloro como desinfetante. Desde então, mais de 600 subprodutos com origem na utilização deste último oxidante, foram identificados (Luukkonen & Pehkonen, 2016).

O interesse no uso de PAA como alternativa ao Cloro, surgiu da expectativa de não formação de subprodutos tóxicos. Até à data, os principais subprodutos identificados após a desinfecção com PAA foram: ácido acético (também designado comumente por vinagre), oxigênio e água, surgindo da sua decomposição espontânea, bem como a formação de ácidos carboxílicos inócuos. Estes subprodutos gerados quer por dissociação espontânea ou reação com matéria orgânica presente nas águas residuais, não apresentam toxicidade ou poder mutagénico para os organismos vivos do meio recetor. (Erba *et al.*, 2004; Kitis, 2004; Santoro *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2002).

Ainda assim, alguns autores sugerem que existem evidências da formação de uma percentagem finita de aldeídos, que se formam proporcionalmente à dosagem de PAA nas águas. No entanto a sua tendência é a desaparecer (Dell, Falsanisi, Liberti, Notarnicola, & Santoro, 2007).

A reação de formação de aldeídos dá-se de acordo com a seguinte expressão:



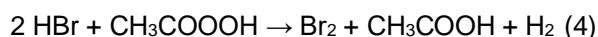
Na qual o CH_3OH representa um simples precursor orgânico numa água residual (Dell *et al.*, 2007).

Uma vez formados, estes podem ser oxidados pelo PAA em excesso a ácidos carboxílicos ou dióxido de carbono, através da seguinte reação, representada pela equação 3 (Dell *et al.*, 2007; Luukkonen & Pehkonen, 2016):



Os aldeídos possíveis de se formarem na desinfecção de uma água residual com PAA são: Formaldeído, Acetaldeído, Nonanal e Decanal. No caso do formaldeído verificou-se que para a dosagem de 10 mg/L de PAA houve formação de, no máximo, 6,1 µg/L deste subproduto. (Luukkonen & Pehkonen, 2016; Santoro *et al.*, 2007).

Foi igualmente observado que com dosagens muito altas - na ordem dos 30 mg/L - e muito baixas - 5 mg/L, pode ocorrer a bromação dos fenóis, caso ocorra intrusão salina em instalações junto à costa. Quando o PAA é utilizado para tratamento de águas enriquecidas com iões Br^- , pode ocorrer a oxidação dos mesmos a Br_2 segundo a expressão (Dell *et al.*, 2007):



Também Wagner *et al.* (2002) sugere que existe formação de clorofenóis, mas que nunca ultrapassaram a concentração máxima de 100 ng/L. O autor refere ainda que as concentrações de subprodutos clorados, bromados ou orgânicos não são consideradas prejudiciais a nível ambiental.

Assim, apesar de estudos sugerirem que existe a possível formação de subprodutos passíveis de ser tóxicos, a quantidade e espectro destes é menor quando comparados com os subprodutos gerados pela utilização do Cloro ou Ozono como desinfetantes (Santoro *et al.*, 2007).

2.7.3. Usos

O interesse no uso de PAA como desinfetante em águas residuais começou em 1980, com diversas publicações sobre este perácido (Wagner *et al.*, 2002). No entanto, foi em 1900-1910 que foram descobertas as suas propriedades esterilizantes e desinfetantes (Luukkonen & Pehkonen, 2016) sendo este utilizado maioritariamente em ambiente hospitalar, devido à natureza segura dos seus componentes (Wagner *et al.*, 2002).

O maior consumidor deste oxidante é o sector da indústria alimentar, que o utiliza como desinfetante na produção de água, processos de limpeza e equipamento de processamento alimentar, bem como para o processo de pasteurização. No sector da saúde é utilizado para esterilização de material e para desinfeção de superfícies hospitalares. A indústria de produção de químicos também utiliza o PAA, maioritariamente para a conversão de cetonas em ésteres (Luukkonen & Pehkonen, 2016). Na figura 10 encontra-se um gráfico que demonstra quais os setores que mais utilizaram este desinfetante em 2013, e qual a quantidade gasta em cada um destes, à escala global.

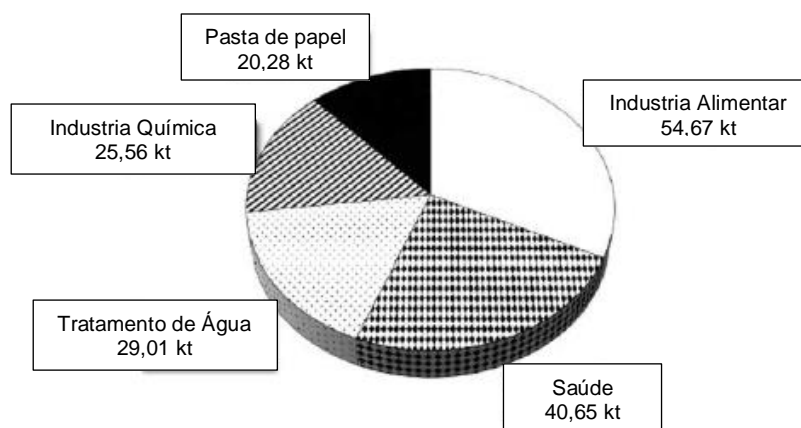


Figura 11 - Indústrias que mais utilizaram PAA como desinfetante, durante o ano de 2013 (Fonte: Luukkonen & Pehkonen, 2017)

2.7.4. Vantagens e Desvantagens

Tal como a maioria dos agentes oxidantes, também o PAA apresenta vantagens e inconvenientes associados à sua utilização. Uma das maiores vantagens deste ácido é a produção de subprodutos inócuos e sem toxicidade para o meio aquático (Kitis, 2004). Sendo o ácido peracético um líquido transparente, o processo de desinfecção é feito por via química, em oposição à radiação UV ou ozonização, o que permite que a sua operação seja simples, com arranque rápido e com baixos custos de manutenção associados (Wagner *et al.*, 2002).

A maior desvantagem verificada foi o aumento do conteúdo orgânico no efluente devido à produção de ácido acético e baixa eficiência contra vírus e parasitas, nomeadamente cistos de *giardia lamblia* e oócitos de *Cryptosporidium parvum*. Na teoria, 5 mg/L de PAA originam cerca de 13 mg/L de ácido acético que resulta num acréscimo de cerca de 14 mg/L de CQO à água residual tratada, sendo que este acréscimo pode potenciar o reaparecimento de microrganismos (Freese & Nozaic, 2004; Kitis, 2004; Luukkonen & Pehkonen, 2016). Uma vez que o ácido peracético ainda não é um oxidante tão utilizado como o cloro, o seu preço de produção e venda tende a ser superior. O preço do PAA é de cerca de 1100-1200 €/t, para uma concentração de 12%, quase 10 vezes superior ao preço do cloro gás. Estima-se ainda que o custo da desinfecção com PAA é de cerca de 0,02000-0,0645 €/m³ de água tratada. O elevado custo de investimento deste oxidante torna-se então um desafio à sua utilização. No entanto, prevê-se que o seu preço diminua a curto prazo, uma vez que este começa a ser utilizado de forma mais frequente na desinfecção de águas e águas residuais (Freese & Nozaic, 2004; Luukkonen & Pehkonen, 2016)

2.8. Enquadramento Legal

- **Diretiva 2000/60/CE de 23 de outubro de 2000**

Também conhecida por Diretiva Quadro da Água, estabelece um quadro de ação no domínio da política da água. Tem como objetivo primário a conservação e melhoria da qualidade das águas superficiais interiores, subterrâneas, águas de transição e águas costeiras (Parlamento Europeu e do Conselho, 2000). Nesta Diretiva são definidos pela primeira vez os termos “substância prioritária”, presentes no Anexo X da mesma, e “substâncias perigosas prioritárias”. O artigo 16 nº 2 determina a obrigatoriedade de apresentação de uma lista que contenha substâncias que apresentem maior risco para o meio aquático, bem como os métodos de identificação dessas mesmas substâncias. Ainda neste artigo, ponto nº4 a Comissão impõe uma revisão da lista prioritária de quatro em quatro anos a contar da data de entrada de vigor desta mesma directiva, bem como apresentação de propostas de controlo das emissões das substâncias presentes na lista prioritária nos termos do ponto nº8 (Parlamento Europeu e do Conselho, 2000).

- **Decisão nº 2455/2001/CE de 20 de novembro de 2001**

Estabelece a lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água, alterando a Diretiva 2000/60/CE. Nesta lista (no Anexo da presente decisão) estão incluídas 33 substâncias consideradas prioritárias das quais 25 são consideradas perigosas prioritárias.

- **Lei nº 58/2005 de 29 de dezembro**

Transpõe a Diretiva 2000/60/CE, aprovando a Lei da Água. Estabelece as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas (Lei nº58/2005 de 29 de Dezembro da Assembleia da República, 2005).

Define igualmente substâncias prioritárias e perigosas prioritárias, referindo que a sua identificação deve ser feita com recurso a avaliações de risco exaustivas ou simplificadas segundo os termos da Diretiva 2000/60/CE artigo 16, nº2 alínea a) e b).

- **Directiva 2008/105/CE de 16 de dezembro de 2008**

Esta diretiva europeia define as normas de qualidade ambiental no domínio da água, alterando a Diretiva 2000/60/CE. Substitui a lista de substâncias prioritárias presente na Diretiva anterior (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2008). Nesta, 20 substâncias são identificadas como substâncias perigosas prioritárias. Define também uma lista composta por 11 substâncias sujeitas a revisão para a identificação como substâncias prioritárias ou perigosas prioritárias (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2008).

- **Directiva 2013/39/UE de 12 de agosto de 2013**

Altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita a substâncias prioritárias. Tem como objetivo alcançar o bom estado químico das águas superficiais, mediante o estabelecimento de normas de qualidade da água para substâncias prioritárias e outros poluentes (Parlamento Europeu e do Conselho, 2013).

A lista de substâncias prioritárias foi revista e substituída pela lista presente no Anexo I desta mesma Diretiva. O artigo nº8-B impõe a criação de uma lista de vigilância (Anexo II) na qual devem ser incluídas as substâncias (ou grupos de substâncias) sujeita a monitorização. Esta lista apresenta igualmente a matriz de análise de compostos bem como o seu método de análise. Dentro desta lista estão incluídos o 17β-Estradiol (E2) CAS 50-28-2 e o 17α-Etinilestradiol (EE2) CAS 57-63-6 (Parlamento Europeu e do Conselho, 2013).

Após revisão da lista presente no Anexo III da Diretiva 2008/105/CE, foram adicionadas substâncias consideradas prioritárias (Anexo I da presente Diretiva). Assim, a lista de substâncias prioritárias, que anteriormente contava com 33 substâncias, passa a incluir 45 substâncias das quais 21 são perigosas prioritárias.

- **Decisão de Execução (UE) 2015/495 de 20 de março de 2015**

Esta decisão surge da necessidade de criação de uma lista de vigilância, imposta no artigo nº8-B da Diretiva 2013/39/EU. Esta lista deve conter um número máximo de 10 substâncias ou grupos de substâncias. Nesta inclui-se o 17β-Estradiol e 17α-Etinilestradiol. No anexo da presente Decisão encontra-se disponível a lista na sua íntegra com identificação das substâncias, o respetivo método analítico e o limite de deteção máximo aceitável (Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de Março, 2015). No caso do 17α-Etinilestradiol o método analítico considerado foi SPE de grande volume e leitura com LC-MS/MS, com limite de deteção de 0,035 ng/L. Para o 17β-Estradiol considerou-se o método analítico SPE e leitura com LC-MS/MS com limite de deteção de 0,4 ng/L (Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de Março, 2015).

2.9. Métodos de quantificação de EDC

2.9.1. Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE)

A quantificação de compostos orgânicos em matrizes gasosas, aquosas ou sólidas, geralmente requer um passo de extração e enriquecimento anterior à separação cromatográfica e detecção, uma vez que as concentrações presentes no ambiente são muito baixas, na ordem dos ng/L, além de que as matrizes nas quais estes compostos se encontram são bastante complexas (Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010). Durante este processo de extração e enriquecimento, os solutos são isolados da matriz, aumentando a sua concentração, o que permite a sua identificação e/ou quantificação (David & Sandra, 2007).

A Extração Sortiva em Barra de Agitação, também conhecida por *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE), foi introduzida no final dos anos 90, tendo sido aplicada com sucesso na análise de diferentes tipos de micropoluentes em matrizes aquosas e sólidas (que incluem amostras de água, solo e sedimentos) (Nollet & Lambropoulo, 2017). A extração por sorção provou ser uma técnica ambientalmente mais viável, comparativamente à extração líquida feita até então (David & Sandra, 2007).

O dispositivo utilizado neste método é constituído por polidimetilsiloxano (PDMS), que se trata de uma fase polimérica não-polar que promove interações hidrofóbicas com moléculas alvo, sendo o mecanismo de retenção feito principalmente por forças de Van-Der-Waals, mas também por ligações de hidrogénio, dependendo da estrutura molecular dos compostos. O PDMS é considerado termo estável, permitindo trabalhar numa ampla gama de temperaturas. (Valcárcel, Cárdenas, & Lucena, 2017). De uma forma geral, quantidade de PDMS usado nas barras varia entre 25-152 μL (X. Huang, Yuan, & Huang, 2008). Além da camada de polímero que envolve toda a barra, esta também inclui um *core* magnético, revestido por uma fina camada vidro e com um comprimento de 15 mm (Nollet & Lambropoulo, 2017; Valcárcel *et al.*, 2017). Na figura 11 encontra-se uma representação da barra SBSE utilizada.

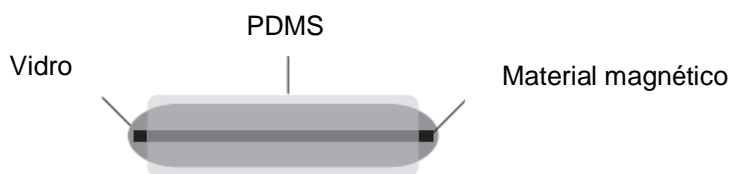


Figura 12 – Esquematização de uma barra extrativa SBSE (Fonte: Nogueira, 2015)

O processo de extração engloba duas fases distintas: a sorção dos analitos à barra, e a dessorção para um solvente específico (R. Dias, 2017). Durante a fase de sorção a barra é inserida diretamente na amostra aquosa, sendo agitada durante um período pré-definido (Nollet & Lambropoulo, 2017) que pode variar entre os 30-240 minutos, sujeito a otimização, dependendo da aplicação (David & Sandra, 2007). No entanto, estudos indicam que as concentrações extraídas foram máximas nos tempos entre 10 a 20 min. A partir dos 40 minutos de agitação não foi observada nenhuma extração adicional (Jiang, Zhang, Tang, Zhou, & Shi, 2014). Quanto maior for a hidrofobicidade dos analitos em estudo, maior será a taxa de recuperação das barras (Valcárcel *et al.*, 2017)

Findo o processo de extração, a barra é retirada da amostra aquosa com auxílio de um íman, e limpa com papel liso de forma a remover quaisquer interferências (como por exemplo, sais, açúcares, proteínas ou outros constituintes) (Valcárcel *et al.*, 2017). O processo de dessorção pode ser feito por duas vias: dessorção líquida (DL) ou dessorção térmica (DT) (David & Sandra, 2007). Na maioria dos casos, a DT é a mais utilizada, no entanto esta é limitada a solutos voláteis e semi-voláteis termicamente estáveis. Por sua vez, a DL (utilizada no presente trabalho) tem uma aplicação mais ampla, sendo mais indicada para compostos termolábeis semi-voláteis e não-voláteis (Valcárcel *et al.*, 2017). No caso da DL, a barra de agitação é colocada num pequeno vial, e o processo é feito com solventes polares, seguido de análise cromatográfica (David & Sandra, 2007). Muitas vezes este processo é auxiliado por sonicação (Nollet & Lambropoulo, 2017).

Tal como a maioria dos métodos de extração, a técnica SBSE apresenta não só vantagens na sua utilização, mas também apresenta algumas limitações. Na tabela 7 mostra-se um pequeno resumo das vantagens e desvantagens deste procedimento analítico.

Tabela 7- Vantagens e Desvantagens do método de extração por SBSE.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none">• Reduz a manipulação da amostra. (Nollet & Lambropoulo, 2017)• Eliminação do uso de solventes orgânicos, simplificando o processo (Nollet & Lambropoulo, 2017).• Superior em sensibilidade relativamente à técnica SPME (Nollet & Lambropoulo, 2017).• Volume de extração mais elevado, quando comparado com SPME (50-250 vezes superior) (David & Sandra, 2007; X. Huang <i>et al.</i>, 2008).• Reutilização da barra de 20 a 100 vezes (Queiroz, 2009).• Aumento do LD para níveis de ppt (Nogueira, 2015).	<ul style="list-style-type: none">• As taxas de recuperação são baixas para solutos com um K_{OW} baixo (David & Sandra, 2007).• Poucos revestimentos comercialmente disponíveis, limitado apenas ao PDMS (Aparicio, Martín, Santos, Malvar, & Alonso, 2017).• Sendo o PDMS uma fase polimérica não-polar, a extração é apenas limitada a compostos igualmente não polares (Aparicio <i>et al.</i>, 2017).

2.9.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD)

A técnica cromatográfica HPLC foi desenvolvida durante os anos 60, através de melhorias à clássica técnica de cromatografia líquida (Reuhs, 2017). A quantificação de hormonas sexuais em amostras ambientais é normalmente efetuada através da técnica de cromatografia gasosa (GC), no entanto o uso do HPLC para este propósito tem vindo a aumentar recentemente devido à sua maior flexibilidade e facilidade de leitura e manuseamento (Locatelli *et al.*, 2016).

O HPLC é constituído por uma bomba, injetor, coluna, detetor e sistema de análise. Ligado a este sistema, encontram-se os reservatórios dos eluentes a utilizar na fase móvel. A bomba é utilizada para fazer com que a fase móvel flua pelo sistema, geralmente a uma taxa de 0,4-1 mL/min, de forma controlada e precisa. De seguida, o injetor posiciona a amostra na fase móvel para que esta possa passar pela coluna (Reuhs, 2017).

As colunas utilizadas normalmente devem ser instaladas com uma pré-coluna de dimensões pequenas (< 5 cm) usadas para proteger a coluna principal de eventuais compostos nocivos (Reuhs, 2017).

As colunas principais têm como duplo objetivo dar suporte à matriz e servir como fase estacionária. A sua constituição pode variar consoante os compostos a analisar, podendo conter sílica ou resinas orgânicas sintéticas (Reuhs, 2017). Para análise de hormonas esteróides é comum a utilização de colunas do tipo C18 com sílica gel modificada, e cujas dimensões são de 250 mm x 4,6 mm (Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010).

Finalmente, o detetor transforma as diferentes concentrações da amostra que passa no efluente da coluna, para sinais elétricos. A escolha do detetor a utilizar vai depender do tipo de soluto bem como da sua concentração, sensibilidade, compatibilidade, entre outros. Neste estudo utilizou-se um detetor de fotodíodos (DAD) que são capazes de providenciar mais informação acerca da composição da amostra (Reuhs, 2017). Na literatura existem diversos relatos da utilização de detetores de fotodíodos para determinar compostos estrogénicos. Tal é possível uma vez que, tantos os estrogénios naturais como sintéticos contêm cromóforos que absorvem luz a um certo comprimento de onda, geralmente na gama dos 197 a 200 nm (Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010)

Na figura 12 pode ser observado o sistema de HPLC utilizado.



Figura 13 – Em sistemas HPLC encontramos (a) os diversos eluentes utilizados para a fase móvel, (b) as colunas onde são feitas as leituras das matrizes, (c) o corpo do sistema e (d) o detetor por fotodíodos (Fonte: da autora).

Contrariamente ao GC-MS, o HPLC não se limita apenas a compostos voláteis ou com pouco peso molecular. Permite também a detecção de inúmeras formas de hormonas esteróides (incluindo os seus conjugados) sem necessidade de derivatização prévia. Aquando a análise de amostras líquidas, como é o caso da água residual, deve ser efetuada uma filtração anterior à leitura, dado o seu elevado teor de sólidos. Os filtros de fibra de vidro são os mais comumente utilizados, cuja dimensão do poro varia entre 0,22 e 1,2 μm (Locatelli *et al.*, 2016).

A vantagem da utilização deste tipo técnica cromatográfica é a rapidez com que se obtém resultados, podendo ser adquiridos em 30 min ou menos, uma larga variedade de fases estacionárias, resolução melhorada, maior sensibilidade e facilidade de recuperação da amostra (Reuhs, 2017). No entanto, oferece algumas desvantagens, como o preço das colunas que por vezes são dispendiosas e com pouca durabilidade. Também os solventes são onerosos e o seu acondicionamento após a utilização do HPLC torna-se difícil (McMaster, 2007)

2.10. Ensaio Ecotoxicológicos

Apesar do ácido peracético ser cada vez mais utilizado em desinfecção de AR, existe ainda escassez de dados relativamente à ecotoxicidade produzida pelos efluentes desinfetados com este oxidante (da Costa *et al.*, 2014). No entanto, sabe-se que o PAA pode desencadear toxicidade no meio, devido à ação do peróxido de hidrogénio que gera radicais livres, e que pode causar stress oxidativo nos organismos aquáticos (Panouille, 2007).

Tkachenko, Kurhaluk, e Grudniewska (2014) estudaram o possível potencial de stress oxidativo causado por desinfetantes derivados do peróxido de hidrogénio ou ácido peracético, em trutas arco-íris. Os autores afirmam que o PAA, por conter formas ativas de oxigénio, pode causar stress oxidativo nos organismos expostos. Afirmam igualmente que a oxidação de macromoléculas presentes nas células, é o principal mecanismo de ação de stress oxidativo do PAA.

Quando o stress oxidativo é desencadeado nas células dos organismos, estes produzem mecanismos de ação antioxidante para combater os chamados ROS (*Reactive Oxygen Species*). Este mecanismo é de extrema importância, pois permite a proteção das células, de modo a prevenir a acumulação de moléculas oxidativas. Nos peixes, este mecanismo envolve o seu sistema enzimático (Altan *et al.*, 2003; Diniz, M. *et al.*, 2015).

A Catalase (CAT) e a Glutathione-S-Transferase (GST) são duas enzimas antioxidantes que auxiliam no processo de degradação de ROS, e são considerados marcadores importantes na identificação da ocorrência do processo de stress oxidativo (Diniz, M. *et al.*, 2015; Sies, 1996).

A catálase tem como função a oxidação do H_2O_2 em água. Encontra-se expressa na maioria das células e a elevadas concentrações no fígado (Pisoschi & Pop, 2015). A GST é a família de enzimas responsáveis pela degradação de subprodutos nocivos causados por poluentes orgânicos, como os metais pesados ou xenobióticos (Farombi, Adelowo, & Ajimoko, 2007; Hayes & Mclellan, 1999).

A Vitelogenina (VTG) é o principal precursor do vitelo de espécies ovíparas, sendo sintetizada principalmente no fígado destes organismos. Ocorre normalmente em fêmeas adultas e peixes juvenis, no entanto estes últimos produzem concentrações menores. Trata-se de um biomarcador ideal para avaliar o efeito dos EDC em espécies ovíparas.(Diniz, M. *et al.*, 2010).

Existem evidências de que o 17 β -Estradiol pode potencializar a produção de VTG em fêmeas e induzi-la em machos. Esta hormona, a seguir ao EE2, é o que apresenta um maior potencial estrogénico (Babin, Cerdà, & Lubzens, 2007; Milla, Depiereux, & Kestemont, 2011). B. Huang *et al.*, (2015) estudaram os efeitos da hormona E2 na espécie *Carassius auratus*, e verificaram que houve um aumento dos níveis de VTG. Estes mesmos resultados já terão sido verificados nos machos dos peixes zebra (*Danio rerio*) e jovens trutas-arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), após a exposição a 20 ng/L de E2.

3. Plano Experimental

De forma a cumprir os objetivos estabelecidos neste estudo, elaborou-se um plano experimental que se encontra descrito na tabela 8.

Tabela 8 – Plano experimental seguido durante o período do presente trabalho.

	Objetivo	Descrição
1ª Fase	Elaboração das curvas de calibração	<ul style="list-style-type: none">• Preparação de padrões com água desmineralizada, a diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200µg/L).• Realização do método SBSE para extração dos compostos e leitura no HPLC.
	Limites de Detecção e Quantificação	<ul style="list-style-type: none">• Elaboração de brancos para leitura dos limites.
2ª Fase	Elaboração dos Brancos	<ul style="list-style-type: none">• Preparação de quatro soluções em água desmineralizada com 50µg/L de compostos.• Realização dos ensaios com concentrações de 1, 5, 10 e 15mg/L de PAA, seguido do método de extração e leitura em HPLC.
	Realização de Ensaios experimentais	<ul style="list-style-type: none">• Realização dos ensaios com água residual tratada e com injeção dos compostos a uma concentração de 50µg/L.• Ensaios com introdução de várias concentrações de PAA (1, 5, 10 e 15µg/L) seguido do método de extração e leitura em HPLC
3ª Fase	Ensaios Ecotoxicológicos com Peixes Zebra	<ul style="list-style-type: none">• Ensaio com peixes zebra em tanques individuais, com injeção de metanol, composto, e água com composto tratada com PAA, em cada uma das divisórias.
	Análise de Resultados	<ul style="list-style-type: none">• Análise à presença da proteína VTG, e da atividade enzimática da CAT e GST.

Na figura 13 encontra-se o cronograma dos trabalhos decorridos com os respetivos intervalos de tempo.

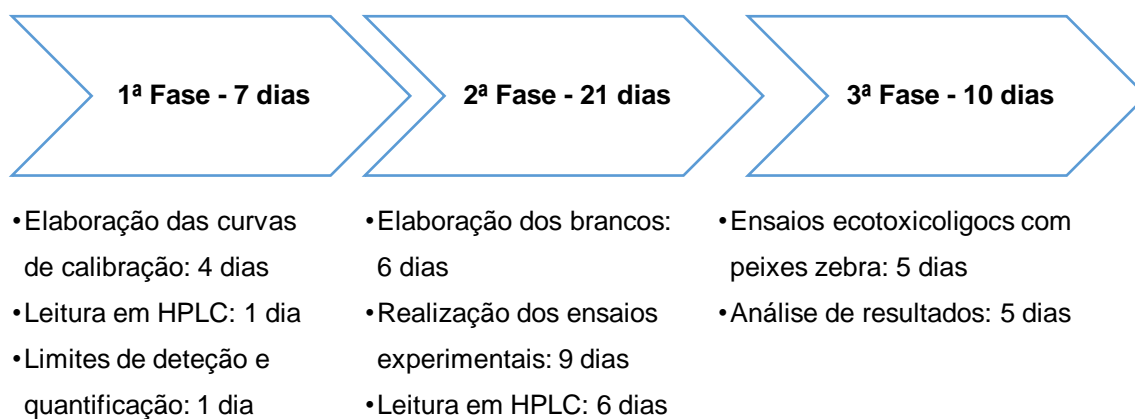


Figura 14- Cronograma dos trabalhos.

4. Materiais e Métodos

4.1. Caracterização da Água Residual

A água residual utilizada no presente estudo foi recolhida na ETAR da Quinta do Conde, no concelho de Sesimbra, a 6 de Maio de 2017. O volume de amostra recolhido foi de 160 L, necessário para a realização de todos os ensaios. Após a análise de CQO e SST, a água foi filtrada e conservada numa câmara frigorífica a 4°C.

4.2. Materiais

Composto:

- 17 β -Estradiol, marca Alfa Aesar, com referência L03801, com 99% de pureza. Para mais detalhes sobre o composto, consultar **Anexo I**;

Reagentes:

- Acetonitrilo (CH₃CN), marca *Carlo Erba Reagents*, CAS nº 75-05-8 M_w (g/mol) = 78,13;
- Metanol (CH₃OH), marca *Honeywell/Riedel-de Haën™*, CAS nº 67-56-1 M_w (g/mol) = 32,04;
- Cloreto de Sódio (NaCl), marca *Sigma Aldrich* $\geq 99,5\%$, CAS nº 7647-14-5 M_w (g/mol) = 58,44;
- Dimetilsulfóxido (DMSO, CH₃SOCH₃), marca *Carlo Erba Reagents*, CAS nº 75-05-8;
- Ácido Fórmico (HCOOH) marca *Panreac*, 98% PA-ACS, M_w (g/mol) 46,03, CAS nº 64-18-6;
- Ácido Peracético (CH₃COOOH), marca Merck KGaA, 38-40% CAS nº 79-21-0;

Barras SBSE: marca *Gerstel Twister™ PDMS*, tipo GC 011555-001-00, espessura do filme: 1 mm, comprimento da barra: 20 mm;

Sistema de HPLC:

- Cromatógrafo, marca *Waters Alliance*, modelo 2690 de bomba quaternária;
- Detetor *photodiode array*, marca *Waters*, modelo 996;
- Pré-coluna C18, marca *Phenomenex*, KJ0-4282;
- Coluna *Luna 5 μ m C18 (2)*, referência (OOF-4252-YO), tamanho LC Column 150x 3 mm;
- Software *MassLynx™ V4.0*;

Sistema de filtração a vácuo:

- Bomba de vácuo, marca *KNF Neuberger*, tipo N035AN 18, pressão máxima de funcionamento 4 bar, motor IP20;
- Filtros de microfibras de vidro, marca *Filter Lab*, porosidade 1,2 μ m, ϕ = 47 mm, Referência MFV3;
- Filtros de papel, marca *Macherey-Nagel*, porosidade 0,4 μ m, ϕ = 45 mm, Referência MN GF5;

Equipamentos para ensaios Ecotoxicológicos:

- Espectrofotômetro, BioRad, Benchmark Microplate reader;
- Centrífuga, VWR by Hitachi Koki Co., Ltd;
- Homogeneizador, Omni International Tissue Master 125, 230V – 125W, 50-60 Hz, 10 000-33 000 rpm;
- Agitador, ELMi Skyline shaker DOS-20D;
- Placas, Nunc-Roskilde;

Balanças:

- Kern 470-36, Max 2000 g, Min 0,5 g, d = 0,01, e = 0,1;
- Mettler Toledo AG 204, Max 210 g, d = 0,1 mg;

Outros equipamentos:

- Acrodisc, marca *Whatman*, Anatop 10, porosidade 0,2 µm, Ø = 10 mm;
- Agitadores magnéticos, marca JP Selecta tipo Agimatic-N;
- Sistema de fluxo de azoto comprimido, marca *Alphagaz* modelo AL 135369, nº CE 231-783-9, Pressão 200 bar;
- Equipamento de Ultrasons, marca *Julabo* tipo USR 3/2, frequência 35 KHz;
- Sistema de aquecimento em banho de água, marca *SBS Instruments*, modelo A – 160;
- Microseringa, marca *Hamilton*, #725 250 µL;
- Vórtex, marca *Fisher Bioblock Scientific*, modelo top mix 11118;
- Potenciômetro, marca *WTW series InoLab*, modelo pH/ION 735;

4.3. Métodos

4.3.1. Curvas de Calibração, Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para quantificação dos compostos e para definição e reprodução dos resultados obtidos, foi necessária a realização de curvas de calibração. Estas resultam numa equação de uma reta que permitiu quantificar os compostos, através das áreas resultantes, após os ensaios com PAA.

Inicialmente foi preparada uma solução-mãe, a uma concentração de 100 mg/L, com os compostos alvo, sendo depois perfeita com metanol. Posteriormente preparou-se 1 L de água desmineralizada para cada concentração a ler, com adição dos compostos através da solução-mãe previamente preparada.

As concentrações consideradas para a realização da curva de calibração foram de 25 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L e 200 µg/L, e as quantidades de solução-mãe adicionadas foram de 250 µL, 0,5 mL, 1 mL e 2 mL respetivamente em cada balão. A figura 14 ilustra a fase de preparação das curvas de calibração.

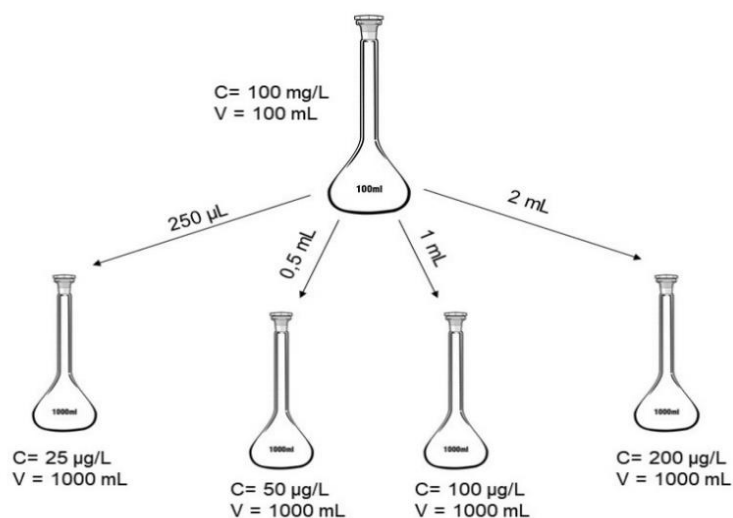


Figura 15 – Preparação das soluções usadas para elaboração das curvas de calibração.

Os Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são dois parâmetros relevantes, uma vez que o LQ representa o mínimo de concentração detetada com precisão e fiabilidade. Já o LD representa o mínimo de concentração que pode ser detetada, mas não é necessariamente quantificada pelo método utilizado. Para determinação do LQ e LD usaram-se brancos, e o método utilizado baseou-se no artigo publicado por Shrivastava & Gupta (2011)

A determinação destes limites foi feita segundo as equações abaixo descritas.

$$\text{LOD } (\mu\text{g/L}) = \text{XB1} + (3 \times \text{SB1})$$

$$\text{LOQ } (\mu\text{g/L}) = \text{XB1} + (10 \times \text{SB1})$$

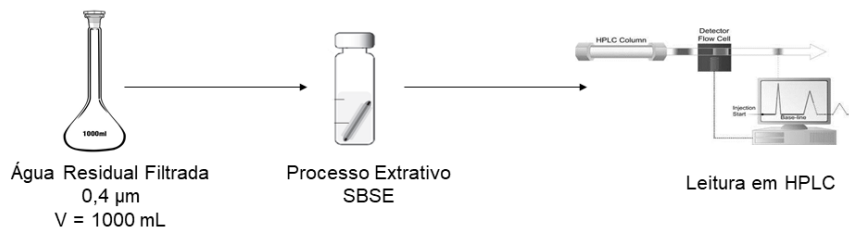
4.3.2. Preparação dos Brancos

Em primeiro lugar, foi preparado um branco somente com água residual por forma a verificar a existência ou não dos compostos alvo na mesma, não havendo adição de analito. Este ensaio terá sido realizado igualmente com 1 L de água residual filtrada e com posterior leitura em HPLC.

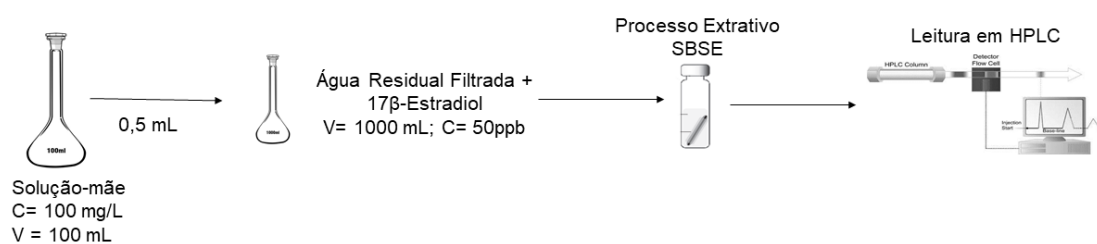
De modo a verificar se os analitos em estudo teriam expressão considerável aquando a leitura em HPLC, foi preparado um branco com água residual adicionando os compostos alvo, em 1 L de água residual filtrada. A concentração de composto analisada foi de 50 µg/L. Foi posteriormente submetido ao processo de extração SBSE e analisado em HPLC.

Finalmente preparou-se, em paralelo a todos os ensaios realizados, brancos com água desmineralizada, compostos e PAA como forma de controlo. Estes ensaios terão sido feitos com recurso a 1 L de água desmineralizada e seguindo os mesmos princípios dos ensaios com água residual, tendo sido submetidos a diferentes concentrações de PAA bem como diferentes tempos de contacto. A figura 15 resume de forma esquemática todo o processo.

1 | Branco Água Residual



2 | Branco Água Residual + 17β-estradiol



3 | Branco Água Desmineralizada + 17β-estradiol + PAA

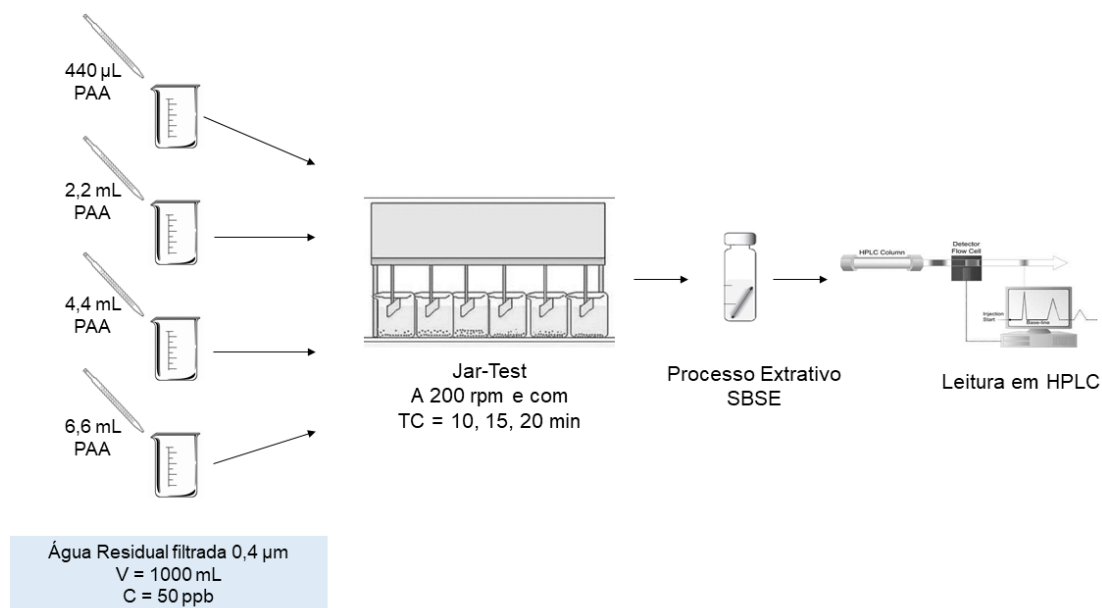


Figura 16 – Esquema representativo dos processos para preparação dos brancos necessários aos ensaios.

4.3.3. *Modo Operatório*

O modo operatório utilizado para a realização deste estudo foi baseado no trabalho desenvolvido pelas autoras Fernandes, 2016 e Vicente, 2016 e aperfeiçoado pelas autoras R. Dias, 2017 e Ribeiro, 2017. O método utilizado para analisar a presença dos compostos na água foi por extração sortiva em barra de agitação (SBSE), e o método analítico utilizado para leitura dos mesmos foi por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) associado a um detetor de fotodíodos (DAD).

Preparação

Em primeiro lugar preparou-se uma solução mista em metanol, a uma concentração de 100 mg/L. Para isso retirou-se 0,01 g de E2 e EE2 para um balão de 100 mL e perpez-se o restante volume com metanol.

Todos os ensaios elaborados foram feitos a partir desta mesma solução mãe, utilizando volumes distintos para atingir as concentrações desejadas.

Procedimento para extração dos compostos

1. Adicionar 25 g de NaCl à amostra (na proporção 100 g/L).
2. Mergulhar a barra SBSE na amostra já salgada.
3. Envolver Erlenmeyer em plástico preto.
4. Extração:
 - a) 3 horas de agitação a 900 rpm;
5. Dessorção:
 - a) Retirar a barra SBSE da amostra previamente agitada para 3 mL de CH₃CN;
 - b) 30 minutos de agitação em CH₃CN a 300 rpm;
 - c) Aquecimento em banho de água durante 1 min a 60°C;
 - d) Passagem da solução resultante por um Acrodisc de 0,2 µm, com auxílio de uma seringa;
 - e) Concentração até à secura sob fluxo de azoto;
 - i. Utilização de vial cónico - quando a solução alcança a parte cónica dos vials, estes devem ser submetidos a ultrassons durante 2-5 segundos;
 - ii. Após passagem pelos ultrassons devem ser transferidos para os inserts, onde a restante solução será seca;
6. Retoma com 0,1 mL (100 µL) com CH₃OH;

Procedimento para lavagem e condicionamento das barras SBSE

1. Colocar a barra em 3 mL de DMSO a agitar durante 1 h a 100 rpm.
2. De seguida, colocar em 3 mL de CH₃CN e pôr a agitar durante 12 h a 100 rpm.
3. Lavagem em ultrassons durante 5 min.

Para que a longevidade das barras se mantenha, é importante que estas sejam colocadas em erlenmeyers de pequena capacidade (25 mL) para evitar danos aquando o movimento giratório da mesma.

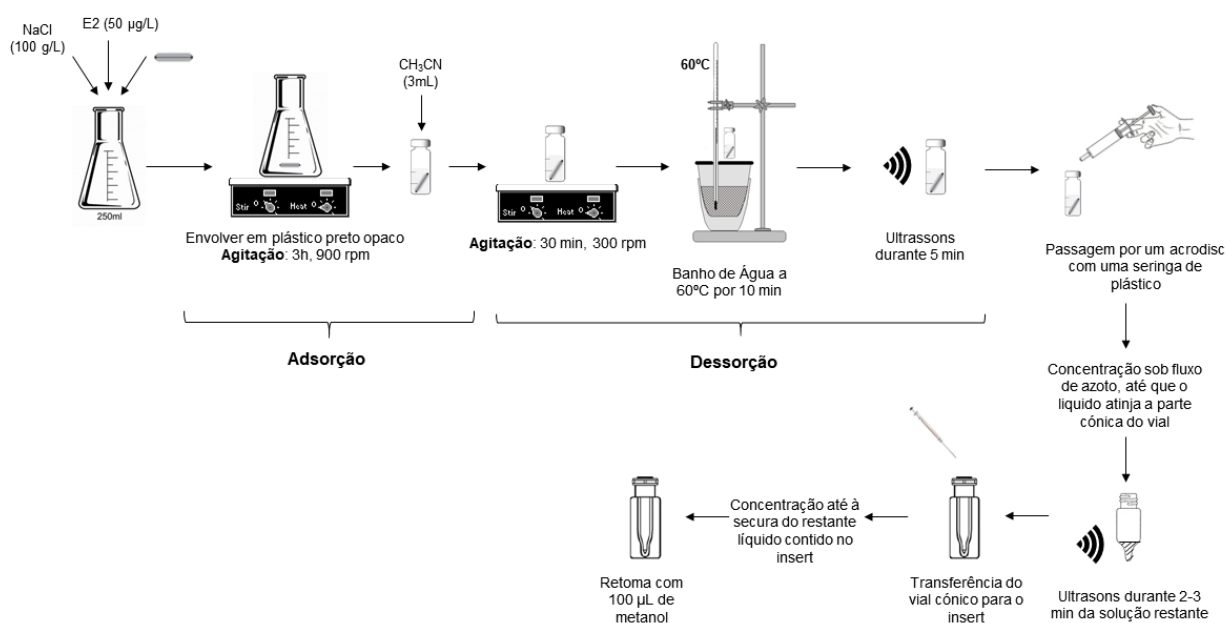


Figura 17 - Esquema da realização do método de extração dos compostos (adaptado de Vicente, 2016).

Na figura 17, encontram-se as condições utilizadas para leitura dos compostos no HPLC. O fluxo inicial foi de 0,5 mL/min para a leitura das curvas de calibração e brancos. No entanto para se obter uma melhor visibilidade dos picos, alterou-se o mesmo para 0,55 mL/min, sendo este último o fluxo final para todos os ensaios com PAA e taxas de recuperação das barras SBSE.

Os eluentes utilizados foram água e acetonitrilo na proporção 50/50. O volume de amostra utilizado foi de 20 µL e o tempo de corrida foi de 10 min em todos os ensaios.

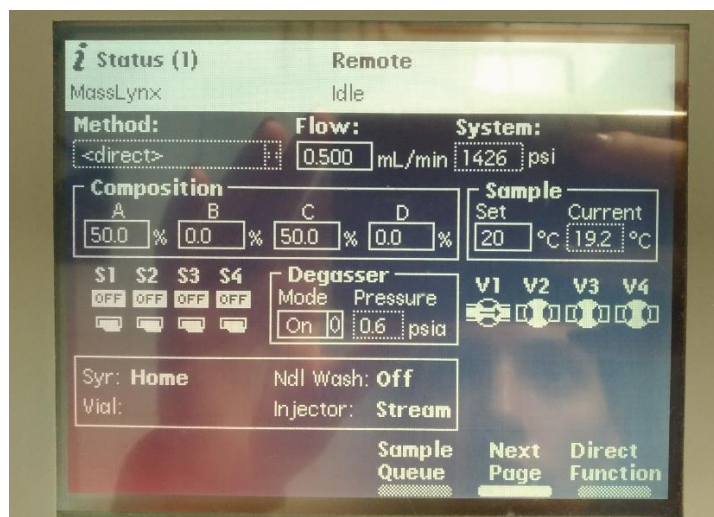


Figura 18 - Condições de funcionamento do HPLC (Fonte: da autora)

4.3.4. Ensaios com PAA

De forma a cumprir o objetivo estabelecido para este trabalho, foram elaborados 3 ensaios Jar-Test para compreender o comportamento do ácido peracético quando em contato com os compostos alvo. Em cada ensaio foram analisadas duas variáveis distintas: o tempo de contacto e a concentração de PAA a adicionar à água residual. A concentração de compostos na água foi constante e toma o valor de 50 µg/L, partindo da solução-mãe anteriormente preparada.

No entanto, devido à elevada concentração a que se encontra o PAA (40%), foi necessária a realização de uma diluição em água desmineralizada, caso contrário os volumes a retirar do reagente seriam muito pouco expressivos. Para isso, retirou-se 5 mL da solução inicial de PAA para um balão volumétrico de 1000 mL e perpez-se o restante com água desmineralizada.

As concentrações de PAA a analisar foram de 1, 5, 10 e 15 mg/L em todos os ensaios realizados. De forma a alcançar as concentrações referidas, foram injetados diferentes volumes de PAA na água residual. A tabela 9 resume os diferentes valores adicionados.

Tabela 9 – Concentrações de PAA utilizadas nos ensaios.

Concentração Final (mg/L)	Volume a injetar (µg/L)
1	440
5	2,2
10	4,4
15	6,6

Relativamente ao tempo de contato, este varia consoante os ensaios realizados (Tabela 10).

Tabela 10 - Tempos de contato utilizados nos ensaios.

Ensaio	Tempos de contato (min)
1	10
2	15
3	20

4.3.4 Quantificação do composto em estudo

Findo o tempo de contato proposto para cada ensaio, procedeu-se ao método de extração, detalhado no ponto 4.2.3. Após o processo de extração foi efetuada a leitura em HPLC, e retiraram-se as áreas dos picos correspondentes ao composto em estudo.

Tendo as áreas dos picos, utilizaram-se as curvas de calibração para calcular a respetiva concentração do E2, apresentadas em 5.1.

4.3.5. **Ensaio Ecotoxicológicos**

O objetivo destes ensaios ecotoxicológicos foi saber em que medida o ácido peracético diminui o nível de estrogenicidade dos compostos em estudo, bem como aferir se induz alguma toxicidade no meio, após a sua descarga, podendo confirmar a sua segurança ambiental.

A espécie *Danio rerio* (*Aquaplante*, Portugal) foi a espécie escolhida, comumente designada de Peixe-zebra. Estes revelam ser modelos de estudo ótimos, uma vez que se trata de uma espécie que apresenta algumas vantagens como pequenas dimensões, de armazenamento fácil, com taxas de fecundidade elevada (Diniz *et al.*, 2015), sendo também de fácil observação e manipulação, além de ser considerado um modelo biológico padronizado (Segner, 2009).



Figura 19 – Foto de um peixe zebra (Fonte: The Zebrafish Lab, 2017)

Os objetos de estudo foram expostos ao composto durante 7 dias, em tanques com 10 L de capacidade em água filtrada e sem cloro, com circuitos de arejamento contínuo ($> 6 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), sendo que o meio terá sido trocado de 48 h em 48 h e contaminado novamente. O fotoperíodo terá sido de 12 h luz:12 h escuro. Após o período de exposição, os peixes foram retirados e armazenados no congelador a uma temperatura de 4°C, sendo posteriormente submetidos para análise.

- **Preparação dos ensaios**

Em primeiro lugar foi preparada uma solução de 100 mL a uma concentração de 100 µg/L de E2. De seguida, injetou-se 1 mL da solução com o composto em 1 L de água desmineralizada e efetuou-se um ensaio Jar-test com uma dosagem de 15 mg/L de PAA e 20 min de tempo de contacto.

Finda esta primeira etapa, dispuseram-se 5 tanques com 10 L de capacidade, com 6 peixes-zebra em cada um. No primeiro tanque não se injetou qualquer tipo de amostra ou composto, sendo a nossa referência para os ensaios.

No segundo tanque injetaram-se 5 mL de solução preparada previamente com E2. No terceiro, injetaram-se igualmente 5 mL da solução de água tratada com PAA, no quarto tanque injetaram-se também 5 mL de PAA, para analisar os possíveis efeitos toxicológicos causados por este oxidante e, finalmente, no quinto tanque apenas se colocaram 5 mL de metanol (Figura 19).



Figura 20 – Distribuição dos tanques onde ocorreu a primeira fase dos ensaios ecotoxicológicos (Fonte: da autora).

Para realização das análises ecotoxicológicas foi necessário um tratamento prévio das amostras *in vivo*, que inclui processos de homogeneização e separação. Para o processo de homogeneização, transferiu-se a amostra para tubo com capacidade de 3 mL, e adicionou-se solução tampão PBS (junção de Na_2HPO_4 com KH_2PO_4 , KCl e NaCl, todos da *Sigma Aldrich*, em 1L de água Milli-Q). De seguida, triturou-se com um homogeneizador.

A solução PBS permite manter a integridade das proteínas presentes no tecido dos peixes-zebra, e encontra-se a um pH de 7,4.

Assim que se obteve uma solução homogénea, separou-se cada amostra em 2 eppendorfs com capacidade de 1,5 mL, obtendo assim duas réplicas para uma mesma amostra. De seguida procedeu-se à separação desta através de uma centrifuga, por um período de 15 min a $10\,000^\circ\text{G}$ e a uma temperatura de 4°C .

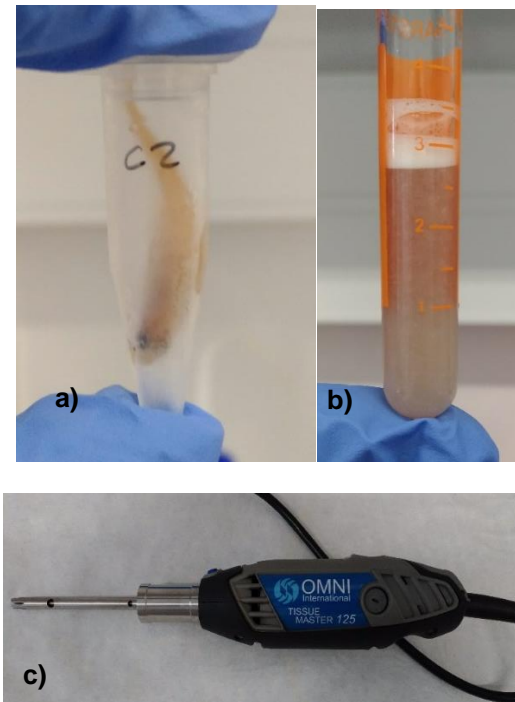


Figura 21 – Pré-tratamento das amostras: após o término do ensaio, (a) as amostras foram colocadas em pequenos eppendorfs e posteriormente (b) homogeneizadas com auxílio de um (c) homogeneizador (Fonte: da autora).

- **Glutathiona-S-Transferase (GST)**

Para a realização deste ensaio foi necessária a preparação de uma mistura reacional que incluiu: 9,8 mL de tampão PBS (*Sigma Aldrich*), 100 μ L de L-Glutathiona Reduzida (*Sigma Aldrich*) e 100 μ L de substrato CDNB (*Sigma Aldrich*). De seguida, injeta-se 20 μ L de cada amostra no respetivo poço da placa e ainda 180 μ L de mistura reacional, preparada previamente.

Após a injeção da amostra com a mistura reacional deve ser efetuada a leitura imediatamente a seguir, num espectrofotómetro (Biorad Benchmark, EUA) a um comprimento de onda de 340 nm, de minuto a minuto durante 6 minutos.

Este procedimento foi baseado no protocolo presente em Habig, Pabst, & Jakoby, 1974.

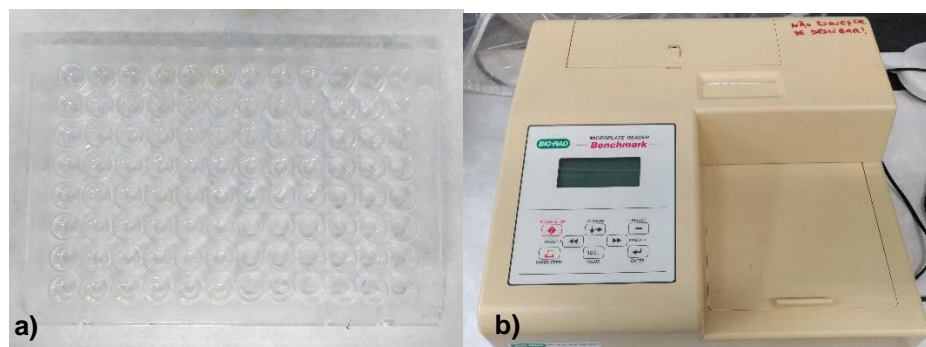


Figura 22 - Do lado direito (a) temos uma placa onde foram depositados os reagentes para posterior (b) leitura (Fonte: da autora).

- **Catalase (CAT)**

Para esta análise começou-se por elaborar a curva de calibração com formaldeído (*Sigma Aldrich*). Para isso foi necessário preparar previamente uma solução de diluída deste reagente.

Num frasco com capacidade de 10 mL, adicionou-se 3,2 µL de formaldeído a 3,7% e fez-se o restante com água Milli-Q. De seguida, em 7 eppendorfs marcados de A-G, adicionou-se uma quantidade conhecida da solução realizada, e o restante com Sample Buffer. Na tabela 11 encontram-se os valores de formaldeído e Sample Buffer (25 mM de fosfato de potássio (*Sigma Aldrich*) com 1 mM de EDTA (*Riedel-Haën*)) adicionados em cada eppendorf.

Tabela 11 – Padrões de formaldeído utilizados para a realização da curva de calibração da CAT. Adaptado do protocolo utilizado para a determinação da enzima.

	Formaldeído (μL)	Sample Buffer (μL)	Concentração Final (μL)
A	0	1 000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

Após a preparação das soluções de formaldeído adicionaram-se 20 μL de cada eppendorf nos poços da primeira coluna da placa, marcado a vermelho na figura 22. Para a análise das amostras, retiraram-se igualmente 20 μL de cada uma e colocou-se nos respetivos poços da placa, identificados a azul.

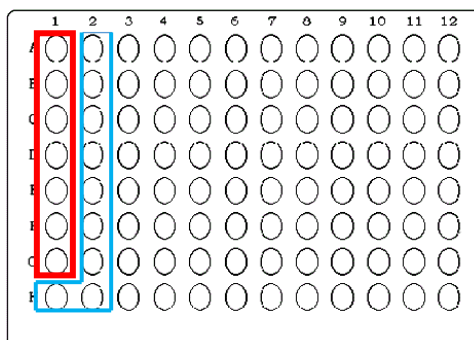


Figura 23 – Representação do método de distribuição das amostras nas placas.

Em todos os poços, quer da curva de calibração quer das amostras, foi adicionado 30 μL de Metanol (*Sigma Aldrich*) e 100 μL de Assay Buffer (*Sigma Aldrich*). A reação foi iniciada com 20 μL de peróxido de hidrogénio (*Sigma Aldrich*) diluído, preparado previamente (num recipiente de 10 mL adicionou-se 3,6 μL de H_2O_2 e perpez-se o restante com água Milli-Q).

Aquando o início da reação, a placa deve ser tapada de imediato com papel de alumínio e posta a agitar no *shaker* durante 20 min a 50 rpm, como se demonstra na figura 23. Passado este período, a placa deve ser retirada e deve ser adicionado de seguida, em todos os poços, 30 μ L de Hidróxido de Potássio (*Sigma Aldrich*) e 30 μ L de Prupald (*Sigma Aldrich*). Tapa-se novamente a placa e leva-se a agitar durante mais 10 minutos.

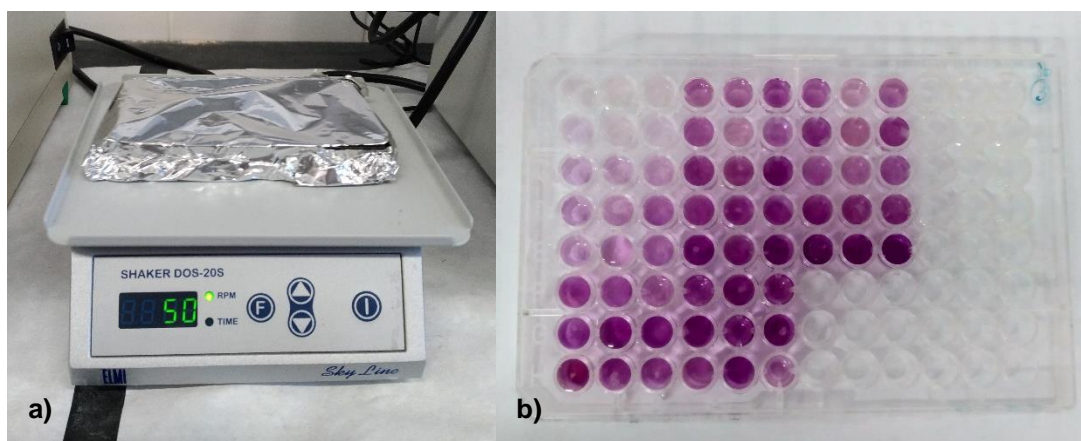


Figura 24 – Do lado direito encontra-se o (a) shaker que tem como objetivo homogeneizar a amostra e do lado direito (b) encontra-se a amostra após ser homogeneizada.

No final, retira-se do shaker e adicionaram-se 10 μ L de Periodato de Potássio e levar ao shaker por mais 5 minutos. Posteriormente deve ser efetuada a leitura da absorvância no espectrofotómetro (Biorad Benchmark, EUA) a um comprimento de onda de 540 nm.

O protocolo seguido foi adaptado de Cayman Chemical Company (2010).

- **Vitelogenina (VTG)**

Em primeiro lugar depositou-se em cada poço da placa 50 μ L da amostra, tendo sido incubada durante a noite a 4°C. Após este primeiro período de incubação, lavou-se a placa 4 vezes consecutivas com solução TBST (10 mM de Tris-HCl + 150 mM de NaCl + 0,05% de Tween, (*Sigma Aldrich*)) para remover o excesso de reagente.

De seguida adicionaram-se 360 μ L de solução branqueadora a cada poço que continha a amostra, e levou-se a incubar a placa durante 2 h à temperatura ambiente. No final, lavou-se novamente 4 vezes com solução TBST.

Posteriormente adicionaram-se 50 μ L de anticorpo (*Biosense*, Noruega) diluído em solução tampão bloqueador (10% BSA, *Nzytech*, em TBST com azida sódica a 0,02%, *Fluka*), levando-se a incubar durante a noite a 4°C. Depois, removeu-se o anticorpo não ligado, e lavou-se a placa 4 vezes com solução TBST. De seguida, adicionou-se um 2º anticorpo diluído em solução bloqueadora e incubou-se durante 2 h à temperatura ambiente.

Por fim, lavou-se novamente 4 vezes com solução TBST, e adicionou-se 100 µL de substrato (10 mg PnPP + 157 mg Tris HCl + 58,4 mg NaCl + 50 µL MgCl₂, pH = 8,8, *Sigma Aldrich*) em cada poço, levando a incubar durante 10 a 30 min à temperatura ambiente. Adicionaram-se posteriormente 50 µL de solução STOP (3 N de NaOH *Sigma Aldrich*) e leram-se as absorvâncias (405 nm) num leitor de microplacas (Biorad Benchmark, EUA).

Este protocolo foi baseado no artigo Njemini, Demanet, & Mets, 2005.

- **Peroxidação Lipídica**

Para a realização desta análise, foi necessária a preparação de padrões de água em conjunto com solução MDA (*Merck Millipore*, Portugal), seguindo as proporções descritas na tabela 12.

Tabela 12 – Padrões de MDA utilizados para a curva de calibração para determinação da concentração para a peroxidação lipídica.

Concentração (μM)	Água (μL) / MDA (μL)
0	1000 / \emptyset
0,001	999 / 1
0,002	998 / 2
0,003	997 / 3
0,004	996 / 4
0,005	995 / 5
0,010	990 / 10
0,020	980 / 20
0,050	950 / 50
0,100	900 / 100
0,200	800 / 200

Após a elaboração dos padrões, prepararam-se eppendorfs nos quais se inseriu: 5 μL amostra + 45 μL de tampão PBS + 12,5 μL de solução SDS (8,1%, *Sigma Aldrich*) + 93,5 μL de solução TCA (Ácido Tricloroacético 20%, *Panreac*) + 50,5 μL de água Milli-Q. De seguida, agitou-se e centrifugou-se durante aproximadamente 1 minuto.

Após a agitação levou-se os eppendorfs a um banho de água a ferver ($\pm 100^\circ\text{C}$) durante 10 minutos. Todos os eppendorfs foram furados com auxílio de uma seringa, para quando submetidos a elevadas temperaturas, haja uma saída de vapor de água de modo a que não se verifiquem elevadas pressões dentro do eppendorf.

Após esta etapa, todos os eppendorfs foram colocados em gelo, e adicionou-se ainda 62,5 μL de água Milli-Q. Homogeneizou-se bem a solução durante 1min.

Finalmente, retiraram-se 150 μL do sobrenadante e adicionou-se em cada poço da placa. De seguida, leu-se no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 530 nm.

O protocolo utilizado foi adaptado de Uchiyama & Mihara (1978).

4.3.6. Ensaios complementares

4.3.6.1. Análises de CQO

O ácido peracético utilizado como desinfetante neste trabalho, apresenta a sua constituição peróxido de hidrogénio, que atua como residual após o processo de desinfecção das águas residuais (Wu & Englehardt, 2012). No entanto, este residual pode interferir com a medição do CQO, um teste frequentemente utilizado para medir a carga poluente presente nas águas (Zhao *et al*, 2004). Para evitar que esta interferência ocorra, recorreu-se ao método descrito por Wu & Englehardt (2012) que se baseia na decomposição catalítica do H_2O_2 (na proporção de 20 g/L) através da adição de Na_2CO_3 e posterior aquecimento em banho de água a 90°C durante 60min.

Para aferir se a interferência de facto existe, realizaram-se 3 análises distintas de CQO, cujo método se encontra descrito no **Anexo II**. Em primeiro lugar analisou-se a CQO em 1 L água residual pura. De seguida injetou-se 15 mg/L de PAA em 1 L água residual com posterior agitação durante cerca de 20 min, e mediu-se a CQO imediatamente após o final da agitação. E por último adicionou-se PAA a 1 L água residual, nas mesmas condições anteriormente descritas, e após a agitação adicionaram-se 20 g de Na_2CO_3 , seguido de um banho de água a 90°C durante 60 min e finalmente, analisou-se o CQO desta última.

Repetiu-se este processo para uma solução padrão, cuja CQO é conhecida e tem um valor de aproximadamente 500 mg $O_2 \cdot L^{-1}$. A repetição da análise para esta solução permite verificar a elegibilidade do método utilizado.

4.3.6.2. Análise do pH

Sendo que o PAA é um ácido, é necessário analisar a alteração de pH que este confere à água residual. Para isso, realizou-se um ensaio com 1 L de água residual, em que se mediu o pH antes e após a adição de PAA. As concentrações de PAA utilizadas foram de 1, 5, 10 e 15 mg/L e o tempo de contato foi de 20 min.

5. Resultados e Discussão

5.1. Curvas de Calibração, LQ e LD

Na figura 24 mostra-se a curva de calibração utilizada nos ensaios para determinação do composto E2. Na tabela 13 estão as informações referentes à equação da reta utilizada para os cálculos das concentrações. No **Anexo III** encontram-se os valores das áreas obtidas para a construção da curva de calibração. Cada amostra foi corrida em triplicado. Os limites de detecção e quantificação para o E2 encontram-se na tabela 14.

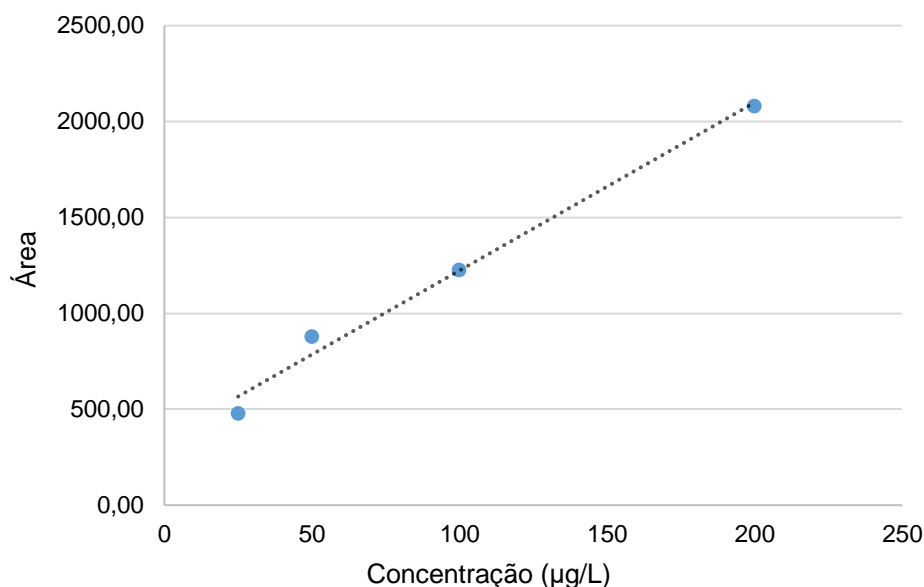


Figura 25 – Curva de Calibração utilizada para cálculo das concentrações.

Tabela 13 – Características da equação da reta, da curva de calibração.

a	b	R ²
8,7519	347,51	0,9879

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação.

LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
7,82	19,80

5.2. Ensaio em Branco

5.2.1. Matriz da AR

A realização do ensaio em branco apenas com água residual permitiu obter o cromatograma que se encontra no **Anexo IV**, e pela sua observação e análise não se verificaram picos correspondentes ao composto em estudo, significando que este não se encontrava na constituição da matriz, ou que não tem expressão suficiente para ser detetado através do método de deteção utilizado. Assim, confirmou-se que não haveria interferência da matriz no decorrer deste trabalho.

5.2.2. Comportamento do E2 na Água Residual

No **anexo V**, encontra-se o cromatograma da amostra da água residual com um spike de E2 de 50 µg/L, para análise da sua expressão na matriz da AR. Como é possível observar, os picos de ambas as concentrações são de expressão considerável permitindo a sua leitura e quantificação. Tal como era esperado, não existiu qualquer interferência com a matriz.

Em todos os ensaios realizados analisou-se qual o tempo de retenção do composto, e verificou-se que este era, em média, 3,98 min. No entanto, pode variar entre 4,01 e 3,98 min.

5.2.3. Branco com água desmineralizada, 17β-Estradiol e PAA

No decorrer dos ensaios com água residual, à qual se adicionou E2 e PAA, foram elaborados brancos com água desmineralizada para observar qual o comportamento do ácido peracético em relação ao E2, sem que houvesse qualquer interferência de outros elementos da matriz. Nos **anexos VI, VII e VIII** encontram-se os cromatogramas de cada branco realizado em cada ensaio.

Após leitura no HPLC e tratamento dos dados, foi possível concluir que o composto foi removido na sua totalidade. Este resultado era esperado, uma vez que não existem interferências de outros compostos na matriz, o que permitiu que a ação desinfetante do ácido peracético tenha incidido apenas no E2.

5.3. Ensaio com Ácido Peracético

Para cumprir o objetivo traçado no presente trabalho, foram realizados 3 ensaios distintos com água residual. O procedimento foi semelhante ao descrito em 4.2.2, mais concretamente no ponto 3 da figura 15.

Findo o processo de extração e após a leitura em HPLC, obtiveram-se os cromatogramas que se encontram nas figuras 42, 43 e 44 dos **anexos IX, X e XI** e as percentagens de remoção do E2 estão representadas na figura 25.

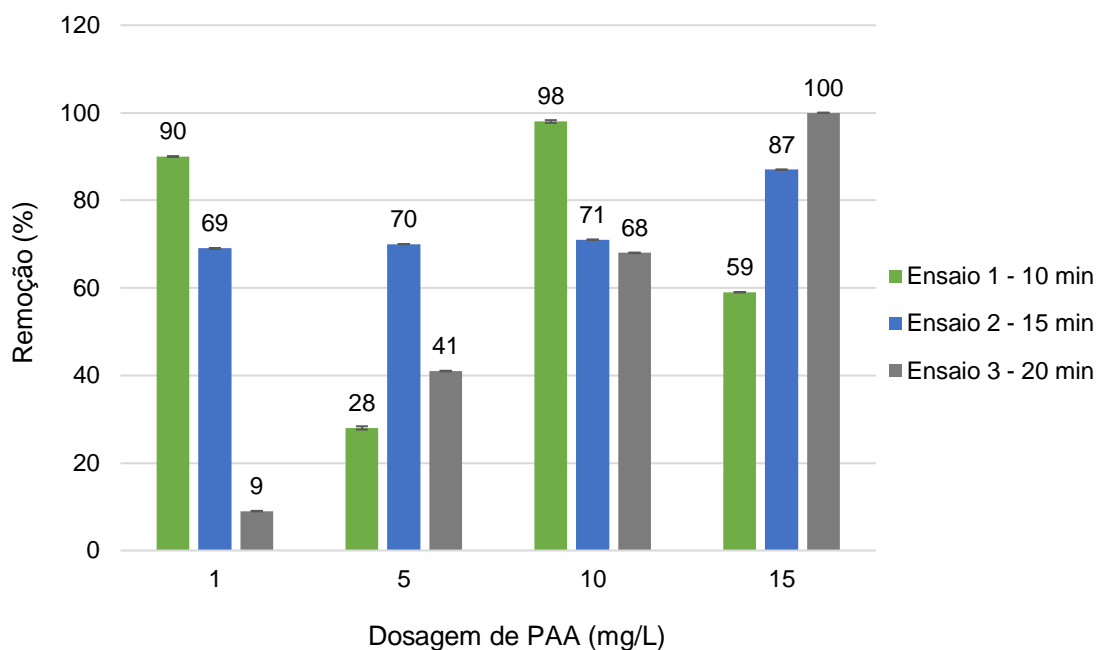


Figura 26 - Percentagens de remoção de E2, por dosagem de PAA e por tempo de contato.

Tabela 15 – Desvio padrão obtido para cada ensaio.

Concentração de PAA	$\sigma_{\text{Ensaio 1}} (\%)$	$\sigma_{\text{Ensaio 2}} (\%)$	$\sigma_{\text{Ensaio 3}} (\%)$
1	4	9	6
5	37	1	7
10	32	2	6
15	4	1	3

O primeiro ensaio correspondeu a um tempo de contato de 10 min, e as eficiências de remoção foram diferentes, consoante a dosagem de PAA. A remoção foi maior para a concentração de 1 mg/L e 10 mg/L, e para as restantes duas não ultrapassou os 60%.

No segundo ensaio, que correspondeu a um tempo de contato de 15min, obtiveram-se percentagens de remoção satisfatórias para todas as concentrações, sendo que a mais elevada foi com uma concentração de PAA de 15 mg/L, com 87% de eficiência.

Finalmente, com um tempo de contato de 20 min conseguiu-se obter uma remoção de 100% com uma concentração de PAA de 15 mg/L. As restantes dosagens não se revelaram eficazes na remoção do composto para este tempo de contato.

Observando o gráfico relativo à eficiência de remoção do composto, é possível constatar que tanto uma dosagem de 10 mg/L como uma 15 mg/L apresentam resultados promissores no sentido de remover o E2. Ainda assim, e tendo em conta o custo deste oxidante, seria mais prudente, numa fase inicial, afirmar que a dosagem de 10 mg/L e um tempo de contato de 20 min seriam suficientes para garantir uma remoção eficiente do composto. Porém, com 15 mg/L e 20 min conseguimos obter uma remoção completa deste analito, ou pelo menos não detetável por este método.

Tendo o cloro como referência para este estudo, e sabendo que o ácido peracético é um desinfetante já utilizado para outras indústrias com cada vez mais expressão na desinfecção de águas e águas residuais, estes resultados correspondem ao esperado. As eficiências de remoção de ambos são comparáveis, com a vantagem do ácido peracético não formar subprodutos tóxicos, como se referiu ao longo do subcapítulo 2.7.2.

5.4. Ensaio Ecotoxicológicos

5.4.1. *Glutathione S-Transferase (GST)*

Como referido no ponto 2.9, a GST tem como principal função a degradação de produtos nocivos, mais concretamente de xenobióticos ou metais pesados, a nível do fígado dos organismos expostos. Esta enzima é capaz de os solubilizar de forma a que a sua excreção seja facilitada através da urina, eliminando a sua presença. Na figura 26 encontram-se as concentrações de GST verificadas nos organismos em estudo, *D. rerio*, e na tabela 15 encontram-se os resultados do teste estatístico que nos permite analisar as diferenças em relação ao controlo.

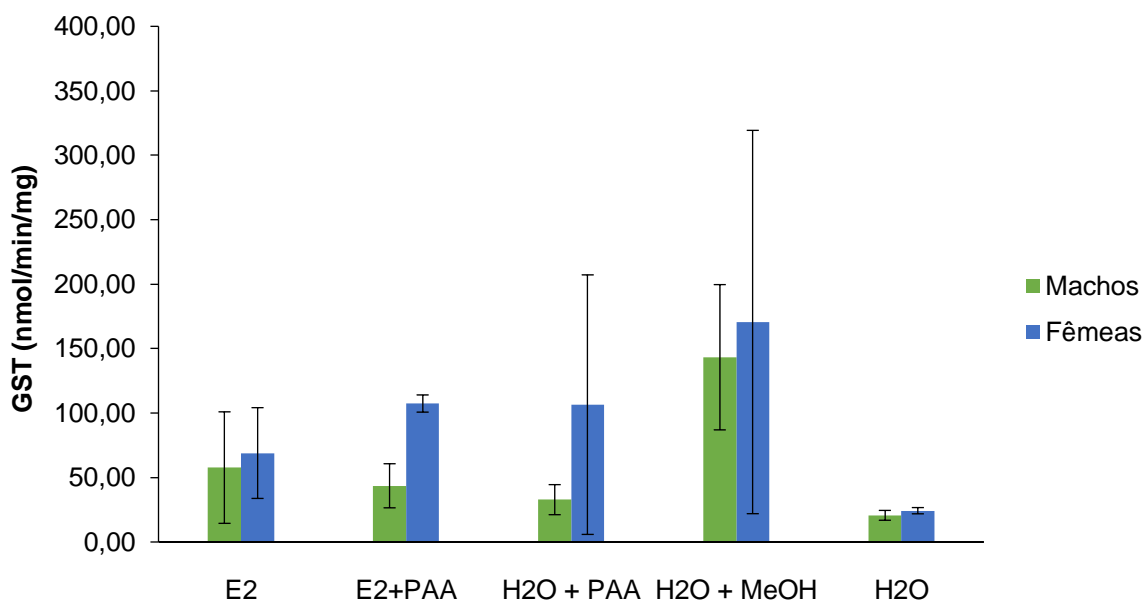


Figura 27 - Concentração de GST em *D. rerio* após exposição a diferentes condições.

A concentração mais elevada desta enzima, quer para macho quer para fêmea, foi a que pertencia à amostra do tanque que continha apenas água e metanol. Este resultado seria esperado uma vez que se sabe que o metanol induz stress oxidativo quer nos organismos vivos quer nos seres humanos, e a comunidade científica conta com inúmeros artigos publicados sobre o tema (Kaviraj, Bhunia, & Saha, 2004; Parthasarathy *et al.*, 2006).

Também, tanto para os machos como para as fêmeas, a segunda concentração de GST mais elevada foi a da amostra que continha água desinfetada com PAA (E2+PAA). Tendo em conta os resultados obtidos no ponto 5.3, acredita-se que todo o E2 tenha sido removido da água, uma vez que as condições utilizadas foram semelhantes e, portanto, este aumento da GST pode dever-se unicamente ao residual de PAA. Este resultado pode ser confirmado pelo teste estatístico que não apresenta diferenças significativas quando se compara a água desinfetada com PAA com a água que contém apenas PAA (E2+PAA/H₂O+PAA).

Estes resultados vão de encontro à premissa de que o PAA pode induzir stress oxidativo nas células dos organismos vivos, despoletando mecanismos de ação antioxidante, nomeadamente da GST, por forma a evitar a oxidação das mesmas.

Tabela 16 - Teste estatístico realizado, comparando as amostras em branco às concentrações GST obtidas.

	Machos	Fêmeas
Controlo (Água)/ E ₂	0,09	0,01
Controlo (Água)/ Controlo (Água + PAA)	0,07	0,05
Controlo (Água)/ E ₂ +PAA	0,02	1,08x 10 ⁻⁰⁷

Controlo (Água)/ Controlo (Água + metanol)	0,002	0,04
E2+PAA/ Controlo (Água + PAA)	0,395	0,991

5.4.2. *Catalase (CAT)*

A catalase teve como principal objetivo a oxidação do H_2O_2 , que como foi revisto no ponto 2.7.3, é um dos principais componentes do ácido peracético, e o responsável pelo residual após a desinfeção.

Para as fêmeas, a concentração mais elevada de CAT verificou-se no tanque que continha água desinfetada com PAA (E2+PAA), seguindo-se do tanque que continha apenas PAA, em terceiro lugar a amostra que continha apenas o composto, e por último os tanques que continham apenas água e metanol (Figura 27). Contrariamente às fêmeas, a concentração mais elevada de CAT, para os machos, verificou-se no tanque que continha apenas o composto, seguindo-se do tanque com água apenas com PAA, em terceiro lugar a água desinfetada com PAA e por último os tanques que continham apenas água e metanol.

No teste estatístico (tabela 16) vemos que existem diferenças significativas tanto para machos como para fêmeas nas amostras que continham E2, indicando o potencial ecotoxicológico deste composto.

Nas amostras que contêm apenas PAA, existem diferenças significativas apenas nas fêmeas. Nas amostras desinfetadas com PAA as diferenças são igualmente significativas para ambos os sexos. No entanto, o metanol não potenciou a atividade desta enzima, não havendo diferenças significativas relativamente ao controlo com água.

Ao analisar a concentração desta enzima, não foi possível definir um padrão de stress oxidativo, uma vez que ambos os sexos apresentam respostas diferentes a diferentes situações de exposição. Ainda assim, os aumentos que ocorreram na concentração de CAT podem ser interpretados como uma resposta de adaptação inicial à exposição do PAA, no sentido de oxidar o principal componente deste desinfetante, o H_2O_2 .

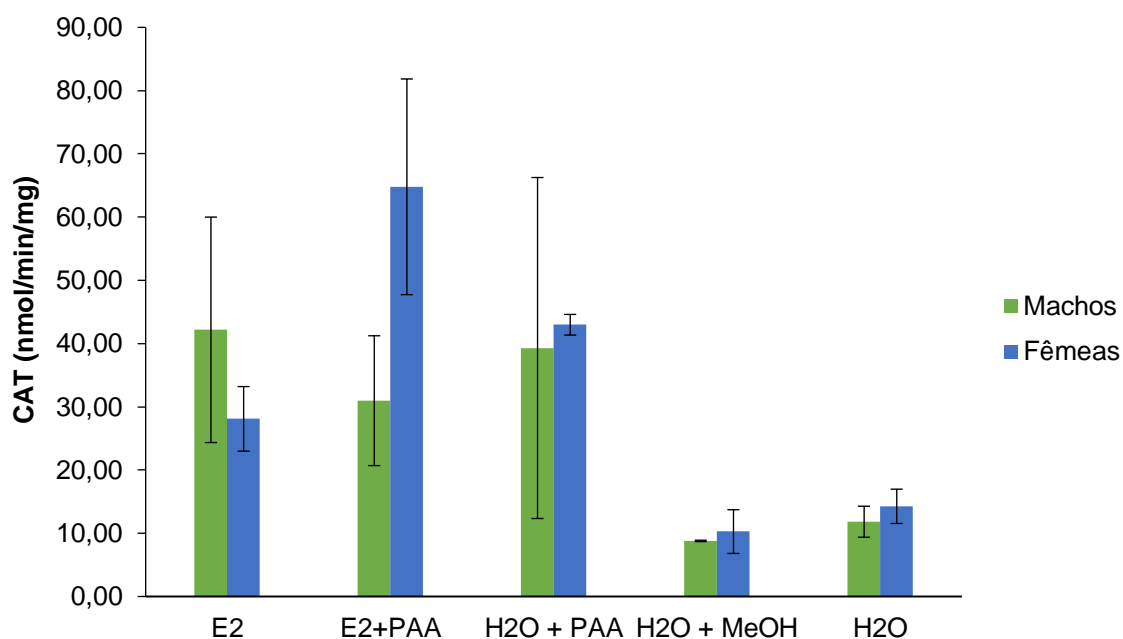


Figura 28 - As diferentes concentrações de Catalase para os diferentes casos de exposição.

Tabela 17 - Teste estatístico realizado, comparando as amostras em branco às concentrações de CAT obtidas.

	Machos	Fêmeas
Controlo (Água)/ E ₂	0,01	0,0019
Controlo (Água)/ Controlo (Água + PAA)	0,05	9,34× 10 ⁻⁰⁶
Controlo (Água)/ E ₂ +PAA	0,005	1,58× 10 ⁻⁰⁴
Controlo (Água)/ Controlo (Água + metanol)	0,08	0,10
E ₂ +PAA/ Controlo (Água + PAA)	0,587	0,214

5.4.3. Peroxidação Lipídica

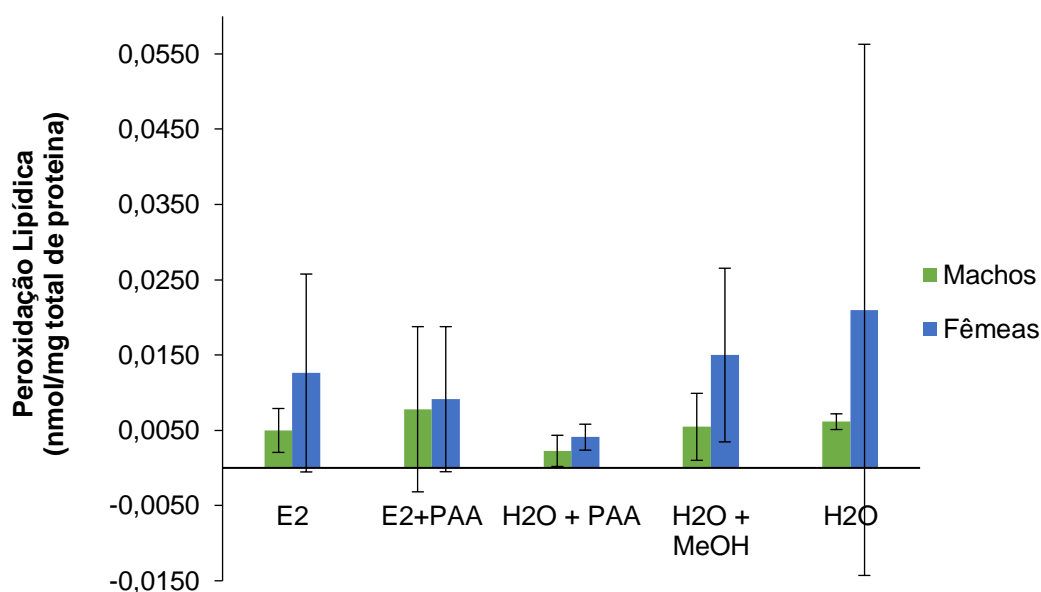


Figura 29 - Níveis de destruição celular, dados pelo indicador de Peroxidação Lipídica, em *D. rerio*.

A peroxidação lipídica também representa um indicador de stress oxidativo importante, uma vez que traduz a destruição das células causada pelos ROS.

Como se pode observar quer pelo teste estatístico quer pela concentração de peroxidação, as diferenças não são significativas nem nos machos, nem nas fêmeas. A única diferença significativa observada, foi na amostra que contém apenas PAA, nomeadamente nos machos, o que também não nos permite definir um padrão de toxicidade. Ainda assim, estes resultados significam que não houve destruição substancial das paredes celulares da maioria dos organismos em teste.

Tabela 18 - Teste estatístico realizado, comparando as amostras em branco às concentrações LIPO obtidas.

	Machos	Fêmeas
Controlo (Água)/ E ₂	0,43	0,76
Controlo (Água)/ Controlo (Água + PAA)	0,01	0,54
Controlo (Água)/ E ₂ +PAA	0,743	0,67
Controlo (Água)/ Controlo (Água + metanol)	0,74	0,79
E ₂ +PAA/ Controlo (Água + PAA)	0,438	0,54

5.4.4. Vitelogenina (VTG)

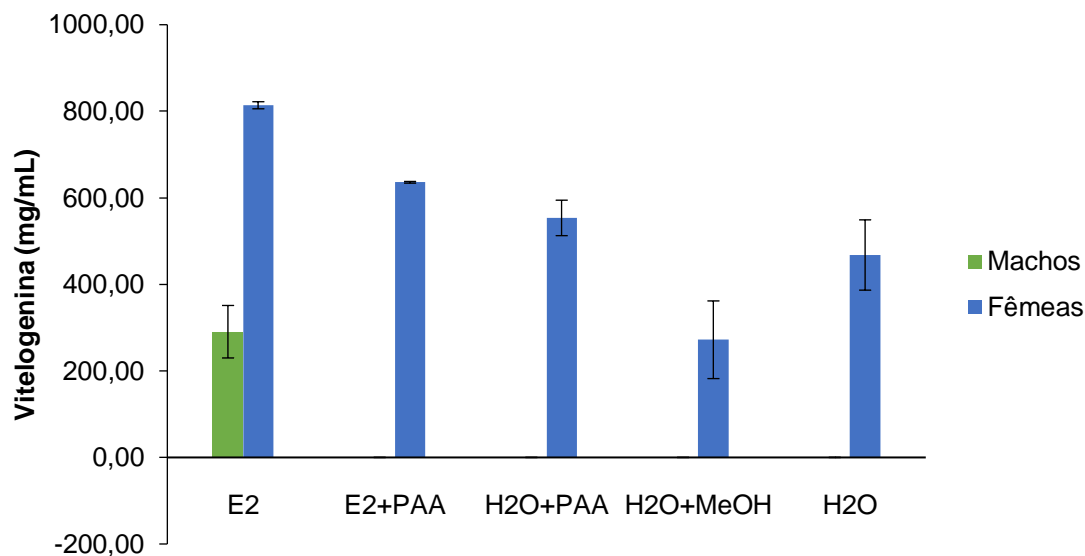


Figura 30 - Níveis de VTG medidos, em machos e em fêmeas.

Tal como seria de esperar, e de acordo com estudos realizados anteriormente referidos no ponto 2.9, observou-se um aumento significativo da VTG nos machos e uma indução da VTG nas fêmeas, quando submetidos ao E2. No entanto, após desinfecção com PAA os níveis de VTG diminuíram aproximando-se do nível de VTG do controlo apenas com água. Na tabela 18 encontram-se os valores da VTG nos machos e nas fêmeas, quando submetidos ao E2 e após a desinfecção com ácido peracético.

Tabela 19 - Concentrações de VTG nos machos e nas fêmeas de *D. rerio*, antes e após o tratamento com PAA e nos diversos brancos.

	Machos	Fêmeas
Controlo (Água)	0,00015	467,84
Controlo (Água + metanol)	0	271,95
Controlo (Água + PAA)	0	553,57
E2	290,56	813,86
E2+PAA	0	635,91

Estes resultados estão de acordo com o estudo feito por Block, Reimers, & Xu, 2015 que observaram uma diminuição no poder estrogénico do E2 e EE2 quando utilizaram ácido peracético para eliminar possíveis subprodutos da desinfecção com cloro.

5.5. Ensaio complementares

5.5.1. Análises de CQO

Na tabela 19 encontram-se os resultados obtidos das análises feitas ao CQO da solução padrão e da água residual.

Como é possível observar, após a adição do ácido peracético, existe um aumento do CQO de ambas as águas. O aumento observado foi de 9,02 mg O₂. L⁻¹ para a solução padrão e de 18,37 mg O₂. L⁻¹ para a água residual. Contrariamente aos resultados obtidos por Wu & Englehardt (2012), os valores de CQO não diminuíram após a adição de Na₂CO₃ seguido de aquecimento. Observou-se, pelo contrário, um aumento da CQO após este processo, que talvez possa ser explicado pela adição de carbono à água, presente no reagente Na₂CO₃, ou pela presença de outros compostos que possam competir com este, não havendo remoção do H₂O₂.

No entanto, não se estudou concretamente a eliminação de peróxido de hidrogénio, algo que talvez fosse importante analisar para confirmar a eficácia deste método, neste contexto.

Assim, seria interessante estudar mais aprofundadamente esta questão para poder discutir mais detalhadamente os resultados obtidos.

Tabela 20 - Valores de CQO medidos antes e após o tratamento com Na₂CO₃, na água residual e na solução padrão.

	CQO Solução Padrão (mg O₂. L⁻¹)		CQO Água Residual (mg O₂. L⁻¹)
Solução Padrão	510,40	Água Residual	41,34
Solução Padrão + PAA	519,42	Água Residual + PAA	59,71
Solução Padrão + PAA + Na₂CO₃	538,24	Água Residual + PAA + Na₂CO₃	68,90

5.5.2. Medição do pH

Os valores de pH obtidos após a leitura, mostram-se na tabela 20, e o pH inicial da AR foi de 7,85. Como se pode observar, a alteração de pH não foi significativa sendo que a diminuição máxima foi de 0,38 unidades de pH, a uma concentração de 15 mg/L de PAA. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia consultada, que indicam que a diminuição de pH não foi substancial nas gamas de concentrações utilizadas para desinfecção.

Sabendo também que o pH da água residual se encontra na gama do neutro, o poder de desinfecção do PAA não foi afetado.

Tabela 21 - Valores de pH medidos consoante a concentração de PAA injetada.

Concentração de PAA (mg/L)	pH
1	7,85
5	7,75
10	7,60
15	7,47

6. Conclusões

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que o Ácido Peracético, além de ser um oxidante eficaz na remoção de organismos patogénicos, apresenta igualmente potencial para remoção de compostos estrogénicos presentes nas águas residuais.

Considerando os valores de concentração de PAA mais utilizados para desinfeção comum (nomeadamente com cloro), bem como os tempos de contato utilizados, pode-se afirmar que a concentração que mais se adequa à remoção do E2 foi a de 15 mg/L com um tempo de contato de 20 min, que se traduziram em eficiências de 100% de remoção.

Adicionalmente, verificou-se que o PAA conseguiu diminuir o potencial estrogénico de E2, dado que os níveis de vitelogenina se mantiveram em níveis normais após a desinfeção com este oxidante.

Do estudo das principais enzimas antioxidantes, concluiu-se que o PAA não produziu níveis de stress oxidativo significativos nos *D. rerio*. Ainda assim, em alguns casos, ocorreu algum stress oxidativo, evidenciado por níveis relativamente elevados da GST e CAT. Este resultado permitiu concluir que o PAA poderá gerar algum stress nos organismos, aquando da descarga de águas desinfetadas com este composto. Mesmo assim, quando comparado com o ozono ou cloro, o PAA apresentou uma menor toxicidade para os organismos aquáticos.

7. Desenvolvimentos futuros

Este estudo permitiu contribuir para uma melhoria da qualidade das massas de água, através da adição de ácido peracético para remoção de alguns compostos emergentes das águas, nomeadamente do E2. Ainda assim, este estudo carece de um aprofundamento de certas questões, nomeadamente:

- Averiguação de possíveis subprodutos do ácido peracético, utilizando métodos analíticos diferentes;
- Aplicação de PAA numa ETAR, e analisar o seu comportamento de remoção de EDC à escala real;
- Efetuar estudo de viabilidade económica da aplicação de PAA como desinfetante, utilizando uma ETAR como caso de estudo.
- Aprofundar o estudo do poder de desinfecção do PAA para os microrganismos *C. parvum* e *Giardia*;
- Explorar a combinação de UV/PAA para remoção de EDC, em águas residuais;
- Analisar com maior detalhe o aumento de CQO derivado da aplicação de PAA nas águas residuais, e explorar o método de remoção de interferência do H_2O_2 com a determinação analítica de CQO;

8. Bibliografia

- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*, 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Ngo, H. H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 274–298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045>
- Altan, Ö., Pabuçcuoglu, A., Altan, A., Konyalioglu, S., & Bayraktar, H. (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British Poultry Science*, 44(4), 545–550. <https://doi.org/10.1080/00071660310001618334>
- Ambiente, A. P. do. (2015). *Pensaar 2020*. *Pensaar 2020* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aparicio, I., Martín, J., Santos, J. L., Malvar, J. L., & Alonso, E. (2017). Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of polar and non-polar emerging and priority pollutants in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1500, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.007>
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., Adams, C. D., & Surampalli, R. Y. (2006a). Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*, 41(3), 525–539. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.017>
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., Adams, C. D., & Surampalli, R. Y. (2006b). Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*, 41(3), 525–539. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.017>
- Auriol, M., Filali-meknassi, Y., Tyagi, R. D., Adams, C. D., Surampalli, R. Y., & Elisa, S. P. E. (2006). Endocrine disrupting compounds removal from wastewater , a new challenge, 41, 525–539. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.017>
- Babin, P. J., Cerdà, J., & Lubzens, E. (2007). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Application*. (P. J. Babin, J. Cerdà, & E. Lubzens, Eds.). Netherlands: Springer.
- Barreiros, L., Queiroz, J. F., Magalhães, L. M., Silva, A. M. T., & Segundo, M. A. (2016). Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review. *Microchemical Journal*, 126, 243–262. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.003>
- Ben Fredj, S., Nobbs, J., Tizaoui, C., & Monser, L. (2014). Removal of estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and 17 α -ethinylestradiol (EE2) from wastewater by liquid-liquid extraction. *Chemical Engineering Journal*, 262, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.007>

- Bergman, A., Heindel J., J., Jobling, S., Kidd A., K., & Zoeller Thomas, R. (2013). *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*. Retrieved from http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/293019/%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-462X2013000100003&lng=pt&nrm=iso&tlng=en%5Cnwww.fsp.usp.br/rsp%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25913228%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. *Quimica Nova*, 30(3), 651–666. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>
- Block, P., Reimers, R., & Xu, Y. (2015). Use of Peracetic Acid as a Wastewater Disinfectant to Eliminate the Formation of Chlorinated Disinfection By-products and Inhibit the Activity of Endocrine Disrupting Compounds. *WEFTEC 2015 Proceedings*, 528–535.
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 238(1–3), 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Boshir, M., Zhou, J. L., Hao, H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 274–298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045>
- Cai, M., Sun, P., Zhang, L., & Huang, C. (2017). Article UV / Peracetic Acid for Degradation of Pharmaceuticals and Reactive Species Evaluation UV / Peracetic Acid for Degradation of Pharmaceuticals and Reactive Species Evaluation. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04694>
- Caliman, F. A., & Gavrilescu, M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean - Soil, Air, Water*, 37(4–5), 277–303. <https://doi.org/10.1002/clen.200900038>
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Garc, C., & Rodr, I. (2004). Behavior of pharmaceuticals , cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Re*, 38, 2918–2926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.029>
- Carvalho, A. R., Cardoso, V., Rodrigues, A., Benoliel, M. J., & Duarte, E. (2016). Fate and Analysis of Endocrine-Disrupting Compounds in a Wastewater Treatment Plant in Portugal. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2910-3>
- Cayman Chemical Company. (2010). Catalase Assay Kit. In *October* (pp. 1–8). EUA.
- Cesaro, A., & Belgiorno, V. (2015). Removal of endocrine disruptors from urban wastewater by advanced oxidation processes (AOPs): a review. *The Open Biotechnology Journal*, 9(1), 151–172. <https://doi.org/10.2174/1874070720151112E012>

- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., & Kroiss, H. (2005). The solids retention time — a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research*, 39, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.036>
- Clouzot, L., & Ce, P. (2008). 17 α -Ethinylestradiol : An Endocrine Disrupter of Great Concern . Analytical Methods and Removal Processes Applied to Water Purification . A Review, 27(3), 383–396. <https://doi.org/10.1002/ep>
- Coelho, A. C., & Vicente, S. A. (2016). Ana Carolina Coelho e Silva Antunes Vicente Contribuição para o Estudo da Remoção do Fármaco 17 α -Ethinylestradiol de Água Residual Urbana Tratada com Recurso ao Processo de Discos Biológicos.
- Coleman, H. M., Vimonses, V., Leslie, G., & Amal, R. (2007). Removal of contaminants of concern in water using advance oxidation techniques. *Water Science and Technology*, 55(12), 301–306. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.421>
- da Costa, J. B., Rodgher, S., Daniel, L. A., & Espíndola, E. L. G. (2014). Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation. *Ecotoxicology*, 23(9), 1803–1813. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1346-z>
- David, F., & Sandra, P. (2007). Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 1152, 54–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.032>
- De Souza, J. B., Queiroz Valdez, F., Jeranoski, R. F., De Sousa Vidal, C. M., & Cavallini, G. S. (2015). Water and Wastewater Disinfection with Peracetic Acid and UV Radiation and Using Advanced Oxidative Process PAA/UV. *International Journal of Photoenergy*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/860845>
- Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de Março. (2015). Lista de substâncias para monitorização a nível a União no domínio da política da água. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 2015(78), 40–42.
- Dell, A., Falsanisi, D., Liberti, L., Notarnicola, M., & Santoro, D. (2007). Disinfection by-products formation during wastewater disinfection with peracetic acid 1, 215(June 2006), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.08.021>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., ... Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Dias, A. C. V., Gomes, F. W., Bila, D. M., Sant'Anna, G. L., & Dezotti, M. (2015). Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>

- Dias, R. (2017). Contribuição para o estudo da remoção biológica simultânea do 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol num reator de discos biológicos.
- Diegues, P., & Martins, V. (2010). Riscos e desafios no âmbito da saúde pública e sustentabilidade do ciclo da água. Lisboa: Direcção Geral da Saúde.
- Diniz, M. S., Maurício, R., Petrovic, M., De Alda, M. J. L., Amaral, L., Peres, I., ... Santana, F. (2010). Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach. *Journal of Environmental Sciences*, 22(10), 1613–1622. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60297-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60297-7)
- Diniz, M. S., Salgado, R., Pereira, V. J., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M. A. M., & Noronha, J. P. (2015). Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 505, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.103>
- Du, Y., Lv, X. T., Wu, Q. Y., Zhang, D. Y., Zhou, Y. T., Peng, L., & Hu, H. Y. (2017). Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 58, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.01.013>
- ECDC. (2011). *Relatório epidemiológico anual 2011*. Estocolmo.
- Efstratiou, A., Ongerth, J. E., & Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research*, 114, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>
- Ejhed, H., Fång, J., Hansen, K., Graae, L., Rahmberg, M., Magnér, J., ... Plaza, G. (2018). Science of the Total Environment The effect of hydraulic retention time in onsite wastewater treatment and removal of pharmaceuticals, hormones and phenolic utility substances. *Science of the Total Environment*, 618, 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.011>
- Erba, A. D., Falsanisi, D., Liberti, L., Notamicola, M., & Santoro, D. (2004). Disinfecting behaviour of peracetic acid for municipal wastewater reuse, 168, 435–442.
- European Chemicals Agency - ECHA. (2017). Estradiol. Retrieved December 4, 2017, from <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.000.022>
- Falconer, I. R., Chapman, H. F., Moore, M. R., & Ranmuthugala, G. (2006). Endocrine-Disrupting Compounds: A Review of Their Challenge to Sustainable and Safe Water Supply and Water Reuse. *Environmental Toxicology*, 21(2), 181–191. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Environmental Research and Public Health*, 4(2), 158–165.

- Fast, S. A., Gude, V. G., Truax, D. D., Martin, J., & Magbanua, B. S. (2017). A Critical Evaluation of Advanced Oxidation Processes for Emerging Contaminants Removal. *Environmental Processes*, 4(1), 283–302. <https://doi.org/10.1007/s40710-017-0207-1>
- Fernandes, S. V. F. (2016). *Contribuição para o Estudo da Remoção Biológica de 17β-estradiol em Águas Residuais*. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias.
- Freese, S. D., & Nozaic, D. J. (2004). Chlorine: Is it really so bad and what are the alternatives? *Water SA*, 30(5), 566–572. <https://doi.org/10.4314/wsa.v30i5.5161>
- Gerrity, D., Gamage, S., Holady, J. C., Mawhinney, D. B., Quiñones, O., Trenholm, R. A., & Snyder, S. A. (2011). Pilot-scale evaluation of ozone and biological activated carbon for trace organic contaminant mitigation and disinfection. *Water Research*, 45(5), 2155–2165. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.12.031>
- Gomes, J., Costa, R., Quinta-Ferreira, R. M., & Martins, R. C. (2017). Application of ozonation for pharmaceuticals and personal care products removal from water. *Science of the Total Environment*, 586, 265–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.216>
- Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2014). Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.10.001>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436300>
- Hamid, H., & Eskicioglu, C. (2012). Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, 46(18), 5813–5833. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002>
- Hassani, G., Babaei, A. A., Takdastan, A., Shirmardi, M., Yousefian, F., & Mohammadi, M. J. (2016). OCCURRENCE AND FATE OF 17 beta-ESTRADIOL IN WATER RESOURCES AND WASTEWATER IN AHVAZ, IRAN. *Global Nest Journal*, 18(4), 855–866.
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4), 273–300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>
- Hodgson, E. (2004). *A Textbook of Modern Toxicology*. (Ernest Hodgson, Ed.) (3rd ed.). Nova Jersey: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471646776>
- Hu, J., Cheng, S., Aizawa, T., Terao, Y., & Kunikane, S. (2003). Products of Aqueous Chlorination of 17β-Estradiol and Their Estrogenic Activities. *Environmental Science and Technology*, 37(24), 5665–5670. <https://doi.org/10.1021/es034324+>

- Huang, B., Sun, W., Li, X., Liu, J., Li, Q., Wang, R., & Pan, X. (2015). Effects and bioaccumulation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.004>
- Huang, X., Yuan, D., & Huang, B. (2008). Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection. *Talanta*, 75(February), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.052>
- Ifelebuegu, A. O. (2011). The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(2), 245–254. <https://doi.org/10.1007/BF03326213>
- Jiang, Y., Zhang, X., Tang, T., Zhou, T., & Shi, G. (2014). Determination of Endocrine Disruptors in Environmental Water by Single-Drop Microextraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters*, 48(4), 710–725. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.958768>
- Kaviraj, A., Bhunia, F., & Saha, N. C. (2004). Toxicity of Methanol to Fish, Crustacean, Oligochaete Worm, and Aquatic Ecosystem. *International Journal of Toxicology*, 23(1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/10915810490265469>
- Khanal Kumar, S., Xie, B., Thompson L., M., Sung, S., Ong, S.-K., & Van Leeuwen, H. J. (2006). Critical Review Fate , Transport , and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. *Environmental Science and Technology*, 40(21), 6537–6546. <https://doi.org/10.1021/es0607739>
- Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review, 30, 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8)
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., & Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, 35(2), 402–417. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.009>
- Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2008). Treatment and Removal Strategies for Estrogens From Wastewater. *Environmental Technology*, 29(3), 245–267. <https://doi.org/10.1080/09593330802099122>
- Kohn, T., Decrey, L., V. (2017). Chemical Disinfectants, (January). Retrieved from [https://infoscience.epfl.ch/record/231118/files/Chemical disinfectants.pdf](https://infoscience.epfl.ch/record/231118/files/Chemical%20disinfectants.pdf)
- Kovacs J., W., & Ojeda R., S. (2011). *Textbook of Endocrine Physiology*. (W. Kovacs J. & S. Ojeda R., Eds.) (6th ed.). Nova lorque: Oxford University Press, Inc.

- Kozłowska-Tylingo, K., Namieśnik, J., & Górecki, T. (2010). Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples—A Review of Chromatographic Methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *40*(3), 194–201. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.490488>
- Lab, T. zebrafish. (2017). Zebrafish and human. Retrieved February 5, 2018, from <http://thezebrafishlab.com/zebrafish-and-human1/>
- Lei nº58/2005 de 29 de Dezembro da Assembleia da República, Pub. L. No. Diário da República: I série-A, nº249, 7280 (2005).
- Li, C., Dong, F., Crittenden, J. C., Luo, F., Chen, X., & Zhao, T. (2017). Kinetics and mechanism of 17 β -estradiol chlorination in a pilot-scale water distribution systems. *Chemosphere*, *178*, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.039>
- Li, M., Xu, B., Liungai, Z., Hu, H. Y., Chen, C., Qiao, J., & Lu, Y. (2016). The removal of estrogenic activity with UV/chlorine technology and identification of novel estrogenic disinfection by-products. *Journal of Hazardous Materials*, *307*, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.003>
- Li, X.-F., & Mitch, W. A. (2017). Drinking Water Disinfection Byproducts (DBPs) and Human Health Effects: Multidisciplinary Challenges and Opportunities. *Environmental Science & Technology*, *acs.est.7b05440*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05440>
- Liu, Z. hua, Kanjo, Y., & Mizutani, S. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment*, *407*(2), 731–748. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.039>
- Liu, Z., Lu, G., Yin, H., Dang, Z., & Rittmann, B. (2015). Removal of Natural Estrogens and Their Conjugates in Municipal Wastewater Treatment Plants: A Critical Review. *Environmental Science and Technology*, *49*(9), 5288–5300. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00399>
- Locatelli, M., Sciascia, F., Cifelli, R., Malatesta, L., Bruni, P., & Croce, F. (2016). Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, *1434*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.034>
- Luo, Y., Guo, W., Hao, H., Duc, L., & Ibney, F. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, *473–474*, 619–641.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., ... Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, *473–474*, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

- Luukkonen, T., & Pehkonen, S. O. (2016). Peracids in water treatment: A critical review, 3389(December). <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1272343>
- Luukkonen, T., & Pehkonen, S. O. (2017). Technology Peracids in water treatment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(1), 1–39. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2016.1272343>
- Maia, D., & Dezotti, M. (2007). *Revisão*, 30(3), 651–666.
- Manibusan, M. K., & Touart, L. W. (2017). Critical Reviews in Toxicology A comprehensive review of regulatory test methods for endocrine adverse health effects. *Critical Reviews in Toxicology*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1272095>
- Matthiessen, P., Wheeler, J. R., & Weltje, L. (2017). A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. *Critical Reviews in Toxicology*, 0(0), 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1397099>
- McMaster, M. C. (2007). *HPLC: A practical user's guide*. (M. C. McMaster, Ed.) (Second Edi). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Mehmet Uzumcu, A. M. Z. (2016). Chapter 9 – Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in the Ovary and on Female Fertility. In *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease* (pp. 143–170). New Jersey, USA: Elsevier.
- Metfalf & Eddy, I., Tchobanoglous, G., Burton, L. F., & Stensel, D. H. (2003). *Metfalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* (4th ed.). Londres/Nova Iorque: McGraw-Hill Education - Europe.
- Milla, S., Depiereux, S., & Kestemont, P. (2011). The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review, 305–319. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0588-7>
- Mohagheghian, A., Nabizadeh, R., Mesdghinia, A., Rastkari, N., Mahvi, A. H., Alimohammadi, M., ... Nazmara, S. (2014). ENVIRONMENTAL HEALTH Distribution of estrogenic steroids in municipal wastewater treatment plants in Tehran, Iran, 1–7.
- Njemini, R., Demanet, C., & Mets, T. (2005). Comparison of two ELISAs for the determination of Hsp70 in serum. *Journal of Immunological Methods*, 306(1–2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.08.012>
- Nogueira, J. M. F. (2015). Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.002>
- Nollet, L. M. L., & Lambropoulou, D. A. (2017). *Chromatographic Analysis of the Environment: Mass Spectrometry Based Approaches*. (L. M. L. Nollet & D. A. Lambropoulou, Eds.) (4th Editio). Florida: CRC Press.

- Panouille, M. (2007). Study of the combined effects of a peracetic acid-based disinfectant and surfactants contained in hospital effluents on *Daphnia magna*, 327–340. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0136-2>
- Parlamento Europeu, & Conselho da União Europeia. (2008). Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008 , relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/C. *Journal Oficial Da União Europeia*, 14.
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2000). Directiva 2000/60/CE. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, (7), 1–72.
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2013). Diretiva 2013/39/UE de 12 de Agosto que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 2013(226), 1–17.
- Parthasarathy, N. J., Kumar, R. S., Manikandan, S., & Devi, R. S. (2006). Methanol-induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *Journal of Occupational Health*, 48(1), 20–27. <https://doi.org/10.1539/joh.48.20>
- Patel, A., Roston, A., Uy, A., Radeke, E., Roston, A., Keith, L., & Zaren, H. A. (2015). Reproductive health and endocrine disruption in women with breast cancer : a pilot study, 411–418. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2381-2>
- Pereira, R. O., Postigo, C., de Alda, M. L., Daniel, L. A., & Barceló, D. (2011). Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, 82(6), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.082>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). European Journal of Medicinal Chemistry The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Prasse, C., Stalter, D., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., & Ternes, T. A. (2015). Spoilt for choice: A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies. *Water Research*, 87(October), 237–270. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.023>
- PubChem Compound Database. (2017). Estradiol. Retrieved November 26, 2017, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/estradiol#section=Top>
- Puckowski, A., Mioduszevska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., & Stepnowski, P. (2016). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment : A review &. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 127, 232–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.049>

- Queiroz, M. E. C. (2009). Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas. *Scientia Chromatographica*, 21–29.
- Reuhs, B. L. (2017). Food Analysis, 213–226. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5>
- Ribeiro, V. (2017). Contribuição para o estudo da remoção de 17 β - Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol em água residual tratada em discos biológicos.
- Richardson, S. D., & Kimura, S. Y. (2017). Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. *Environmental Technology and Innovation*, 8, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.04.002>
- Santoro, D., Gehr, R., Bartrand, T. A., Liberti, L., Notarnicola, M., Dell'Erba, A., ... Haas, C. N. (2007). Wastewater Disinfection by Peracetic Acid: Assessment of Models for Tracking Residual Measurements and Inactivation. *Water Environment Research*, 79(7), 775–787. <https://doi.org/10.2175/106143007X156817>
- Schäfer, A. I., Akanyeti, I., & Semião, A. J. C. (2011). Micropollutant Sorption to Membrane Polymers: A Review of Mechanisms for Estrogens. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.09.006>
- Schiliró, T., Pignata, C., Rovere, R., Fea, E., & Gilli, G. (2009). The endocrine disrupting activity of surface waters and of wastewater treatment plant effluents in relation to chlorination. *Chemosphere*, 75(3), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.028>
- Segner, H. (2009). Zebrafish (Danio rerio) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.099>
- Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., & Mcinnis, R. (2005). Distribution of estrogens , 17 h -estradiol and estrone , in Canadian municipal wastewater treatment plants, 336(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.025>
- Shannon, M. A., Bohn, P. W., Elimelech, M., Georgiadis, J. G., Mariñas, B. J., & Mayes, A. M. (2008). Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 452(7185), 301–310. <https://doi.org/10.1038/nature06599>
- Shareef, A., Angove, M. J., Wells, J. D., & Johnson, B. B. (2006). Aqueous Solubilities of Estrone , 17 -Estradiol , 17 r -Ethinylestradiol , and Bisphenol A, 879–881. <https://doi.org/10.1021/je050318c>
- Shrivastava, A., & Gupta, V. B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, 2(1), 21–25. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Sies, H. (1996). Oxidative Stress: Oxidantes and Antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291–295.

- Silva, C. P., Otero, M., & Esteves, V. (2012). Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution*, 165, 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.002>
- Sousa, A., Schönenberger, R., Jonkers, N., Suter, M. J. F., Tanabe, S., & Barroso, C. M. (2010). Chemical and biological characterization of estrogenicity in effluents from WWTPs in ria de Aveiro (NW Portugal). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9324-9>
- Tarpani, R., & Azapagic, A. (2018). Science of the Total Environment A methodology for estimating concentrations of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in wastewater treatment plants and in freshwaters. *Science of the Total Environment*, 622–623, 1417–1430. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.059>
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., & Wilken, R. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.
- Timms, B. G., Howdeshell, K. L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C. A., & vom Saal, F. S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19), 7014–7019. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502544102>
- Ting, Y. F., & Praveena, S. M. (2017). Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5890-x>
- Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R. D., & Buelna, G. (2017). Bioresource Technology Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource Technology*, 224, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.042>
- Tkachenko, H., Kurhaluk, N., & Grudniewska, J. (2014). Oxidative stress biomarkers in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Disinfectant-CIP formulated with peracetic acid and hydrogen peroxide. *Archives of Polish Fisheries*, 22(3), 207–219. <https://doi.org/10.2478/aopf-2014-0021>
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
- Urban, V., Block, J. C., Environement, S., Pharmacie, F. De, & Lebrun, A. (1993). BIOFLOCCULATION IN ACTIVATED SLUDGE : AN ANALYTIC APPROACH *Bacteriology*, 27(5), 829–838.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., & Lucena, R. (2017). *Analytical Microextraction Techniques*. (M. Valcárcel, S. Cárdenas, & R. Lucena, Eds.). Espanha: Bentham Science Publishers.

- Vicente, A. C. C. e S. A. (2016). Contribuição para o Estudo da Remoção do Fármaco 17 α - Ethinilestradiol de Água Residual Urbana Tratada com Recurso ao Processo de Discos Biológicos, 257.
- Wagner, M., Brumelis, D., & Gehr, R. (2002). Disinfection of Wastewater by Hydrogen Peroxide or Peracetic Acid : Development of Procedures for Measurement of Residual Disinfectant and Application to a Physicochemically Treated Municipal Effluent, (February).
- Wintgens, T., Gallenkemper, M., & Melin, T. (2002). Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination*, 146, 387–391.
- Wu, T., & Englehardt, J. D. (2012). A new method for removal of hydrogen peroxide interference in the analysis of chemical oxygen demand. *Environmental Science & Technology*, 46(November 2015), 2291–8. <https://doi.org/10.1021/es204250k>
- Xu, N., Xu, Y. F., Xu, S., Li, J., & Tao, H. C. (2012a). Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: A Chinese perspective. *Environmental Pollution*, 165, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.025>
- Xu, N., Xu, Y., Xu, S., Li, J., & Tao, H. (2012b). Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants : A Chinese perspective. *Environmental Pollution*, 165, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.025>
- Zhang, Z., Feng, Y., Gao, P., Wang, C., & Ren, N. (2011). Occurrence and removal efficiencies of eight EDCs and estrogenicity in a STP. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(5), 1366–1373. <https://doi.org/10.1039/c0em00597e>
- Zhao, H., Jiang, D., Zhang, S., Catterall, K., & John, R. (2004). Development of a Direct Photoelectrochemical Method for Determination of Chemical Oxygen Demand. *Analytical Chemistry*, 76(1), 155–160. <https://doi.org/10.1021/ac0302298>

Anexos

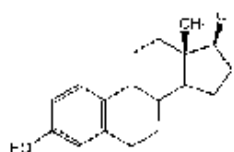
Anexo I – Especificação do Composto 17β-Estradiol

Product Specification

Alfa Aesar®

L03801 beta-Estradiol, 99% (dry wt.), ca 3% water

Product Number: L03801
CAS number: 50-28-2
MDL number: MFCD00003693
Molecular formula: C₁₈H₂₄O₂
Molecular weight: 272.39



Product Specification

Appearance (Color): White
Form: Powder
Assay (Silylated GC): > 98.5%
Water Content (Karl Fischer Titration): <4.0%
Optical Rotation: +79.0° ± 3.0° (c=1 in Dioxane)

Date of Print: February 13, 2018
Version: 5

Product Specifications are subject to amendment and may change over time.

CONTACT

ALFA Aesar
T: +33 (0)2 32 18 58 00
E: alesa@alfa.com

ALFA Aesar
T: +33 (0)2 32 18 58 00
E: alesa@alfa.com

ALFA Aesar
T: +33 (0)2 32 18 58 00
E: alesa@alfa.com

ALFA Aesar
T: +33 (0)2 32 18 58 00
E: alesa@alfa.com

ALFA Aesar
T: +33 (0)2 32 18 58 00
E: alesa@alfa.com

ALFA Aesar
T: +33 (0)2 32 18 58 00
E: alesa@alfa.com

www.alfa.com

Anexo II – Cromatograma do composto 17 β -Estradiol

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

12_06_2017_SBSE_E2_100ppb1

Diode Array
281
8.88e3

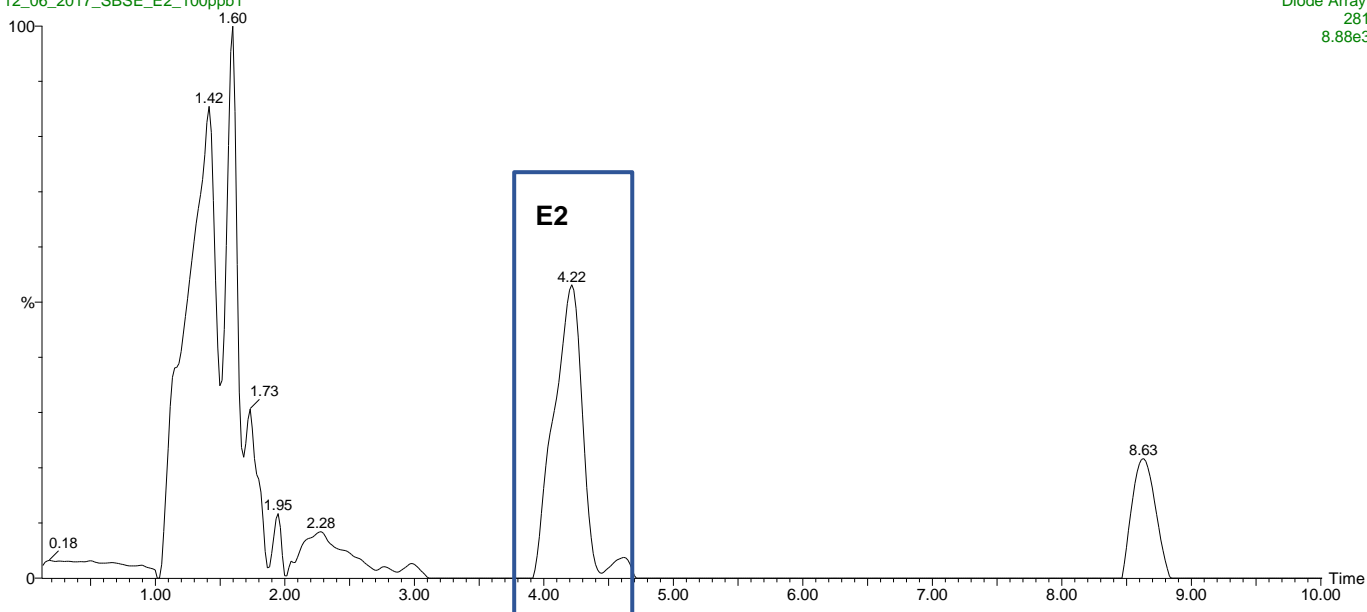


Figura 31- Água desmineralizada com *spike* de 10 ppb de E2, para análise do tempo de saída do composto (tr = 4,22 min).

Anexo III – Método de determinação da CQO

O protocolo utilizado é baseado no protocolo das aulas de *Laboratório Operações e Processos*, lecionadas pela Professora Leonor Amaral.

- Determinação da CQO

1. 10 mL da amostra para um tubo do aparelho de refluxo + 5 mL de dicromato de potássio + cerca de 3 reguladores de ebulição. A mistura deve ser agitada cuidadosamente para homogeneização;
2. Juntar 15 mL de solução de ácido sulfúrico de prata e ligar rapidamente o tubo refrigerante;
3. Levar a mistura reacional à ebulição durante 3 horas a uma temperatura de aproximadamente $148^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$;
4. Arrefecer o tubo até uma temperatura de 60°C com lavagem simultânea do tubo refrigerante, com auxílio de água destilada.
5. Titular o excesso de dicromato de potássio com uma solução de sulfato de ferro (II) e amónio, adicionando cerca de 2-3 gotas de solução indicadora de ferroína;

Os cálculos da determinação de CQO são feitos através da fórmula seguinte:

$$\text{CQO (mg O}_2\text{.L}^{-1}) = \frac{8000 \cdot c \cdot (V_1 - V_2)}{V_0}$$

Na qual:

c = concentração (mol/L) da solução de sulfato de ferro (II) e amónia.

V_0 = volume (mL) da toma para ensaio, se ocorrer;

V_1 = volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumida no ensaio em branco;

V_2 = volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumida no ensaio com a amostra;

8000 = massa molar (mg/L) de $\frac{1}{2}$ de O_2 ;

- Determinação dos valores dos Ensaio em Branco

O método de determinação é em tudo semelhante ao descrito anteriormente, no entanto, a toma para amostra é substituída por 10 mL de água destilada.

- Verificação molar da solução de sulfato de ferro (II) e amónio

1. Diluir 10 mL da solução padrão de referência de dicromato de potássio em 100 mL de ácido sulfúrico, juntamente com 2-3 gotas do indicador ferroína. Titular com solução de sulfato de ferro (II) e amónio.
2. A concentração, c (mol/L), da solução de sulfato de ferro (II) e amónio é dada pela expressão seguinte:

$$c = \frac{2,4}{V}$$

Onde V é o volume consumido na titulação com solução de sulfato de ferro (II) e amónio.

Anexo IV – Dados utilizados para a determinação da curva de calibração

E2		
Concentração (µg/L)	Área	Média
25	506,91	480,80
	465,27	
	470,23	
50	1193,93	881,48
	810,08	
	640,42	
100	1210,55	1227,75
	1227,60	
	1245,10	
200	3999,30	2081,95
	1727,24	
	1440,10	
	1161,14	

Anexo V – Cromatograma da Água Residual sem compostos

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

09_06_2017_SBSE_AR

Diode Array
281
1.36e4

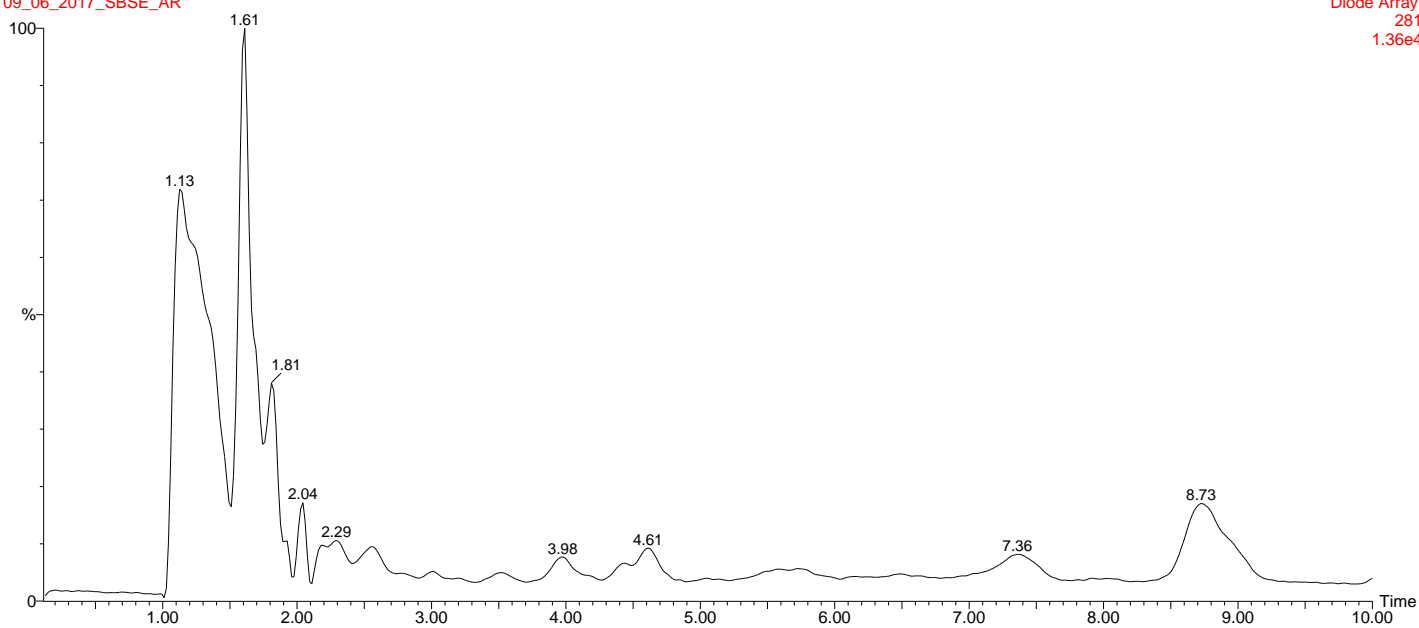


Figura 32- Água residual utilizada no estudo, sem *spike* de composto.

Anexo VI – Cromatograma da Água Residual com *spike* de 50 ppb

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
09_06_2017_SBSE_AR50ppb1

Diode Array
281
1.28e4

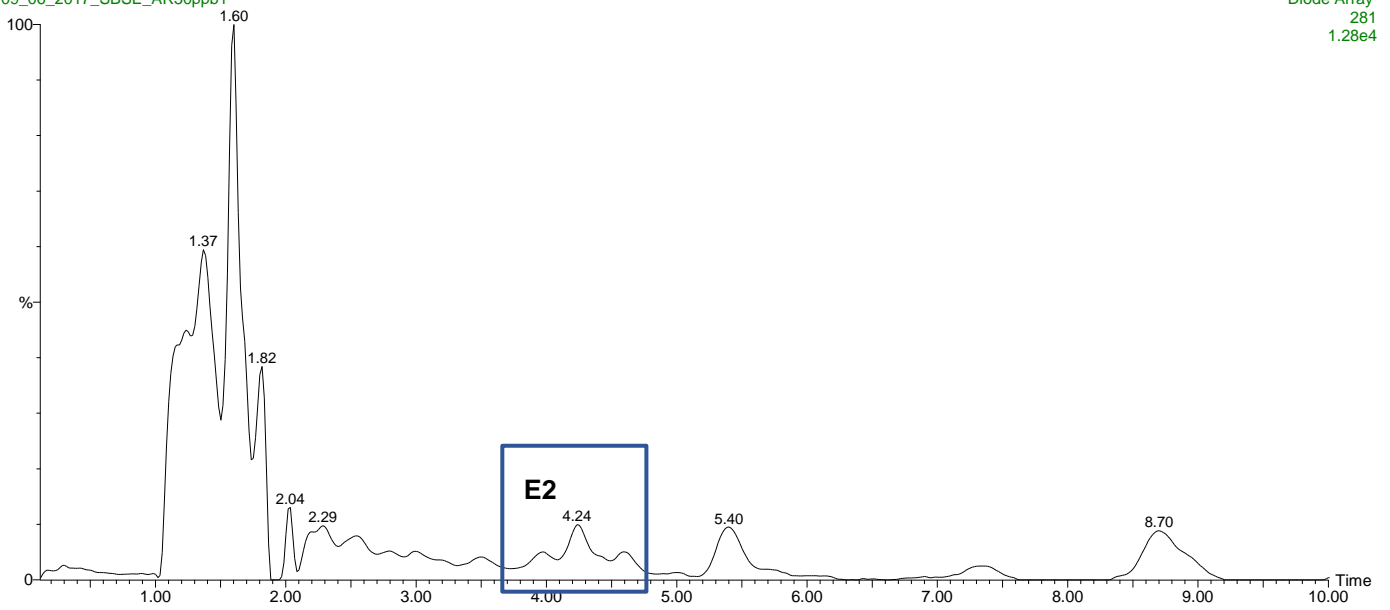


Figura 33- Água residual com um *spike* de 50 ppb de E2, para análise da expressão do analito na matriz.

Anexo VII – Cromatogramas do Branco do Ensaio 1

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

23_06_2018_Ensaio1_Branco1_1ppm

Diode Array
281
1.40e4

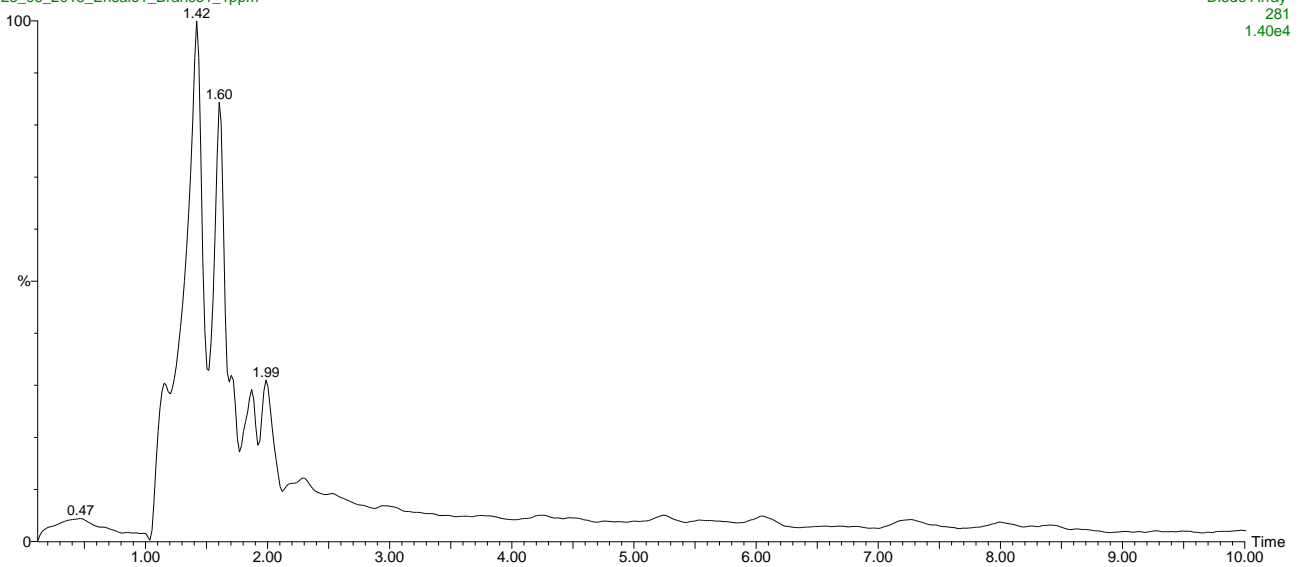


Figura 34 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 1 ppb de PAA.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

23_06_2018_Ensaio1_Branco1_5ppm

Diode Array
281
1.73e4

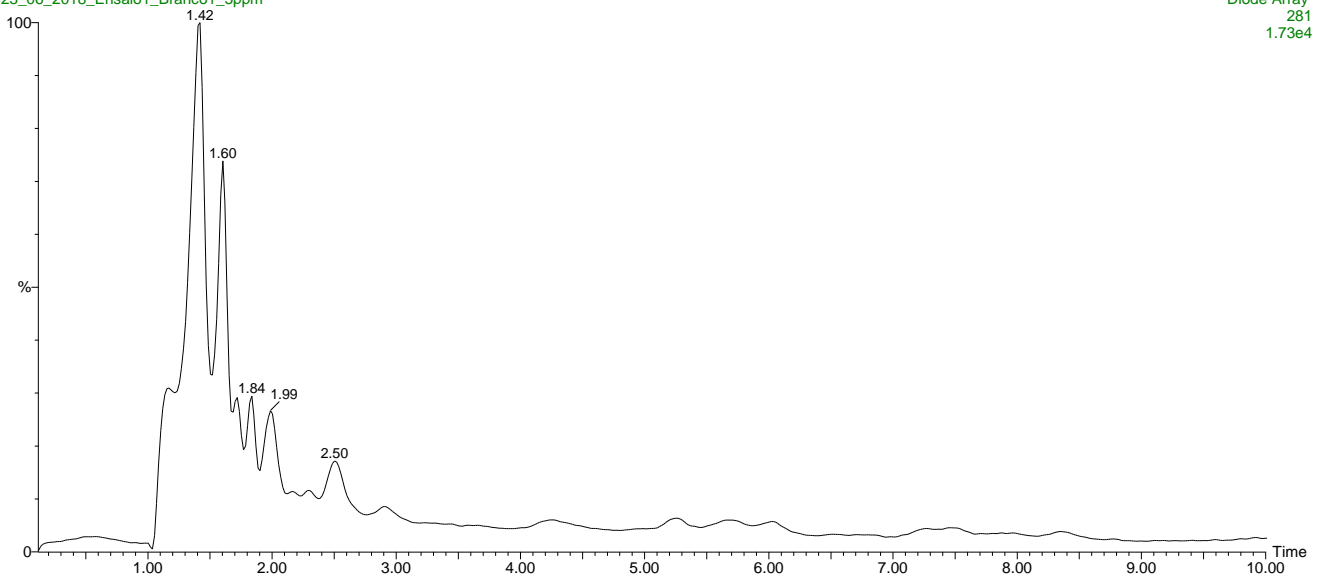


Figura 35 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 5 ppb de PAA.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

23_06_2018_Ensaio1_Branco1_10ppm

Diode Array
281
2.04e4

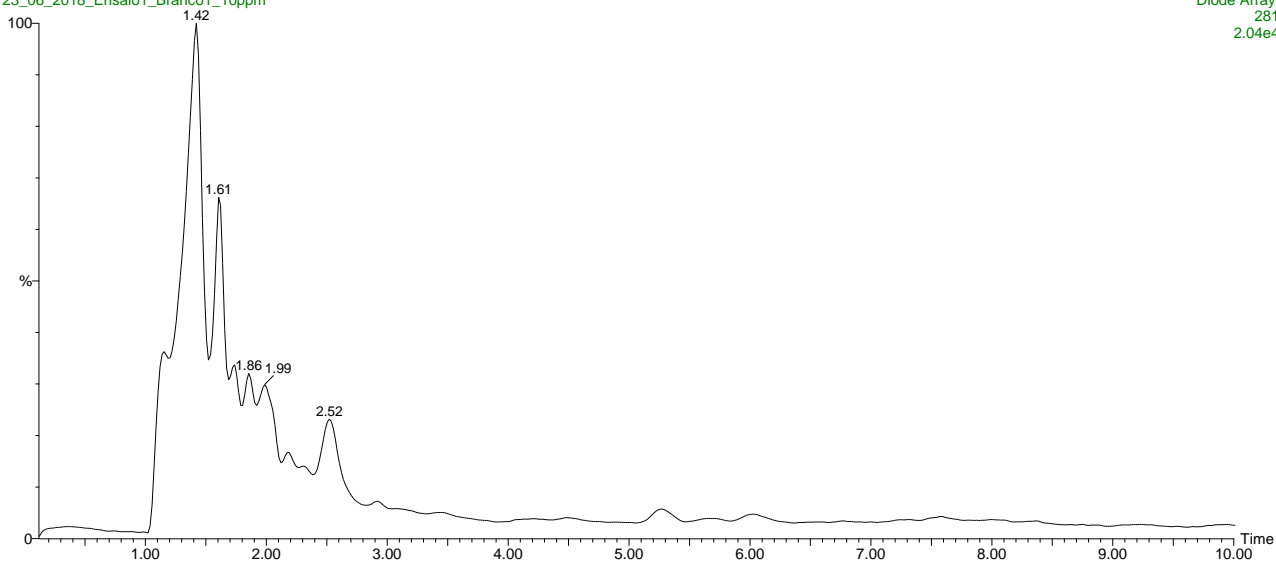


Figura 36 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 10 ppb de PAA.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

23_06_2018_Ensaio1_Branco1_15ppm

Diode Array
281
2.51e4

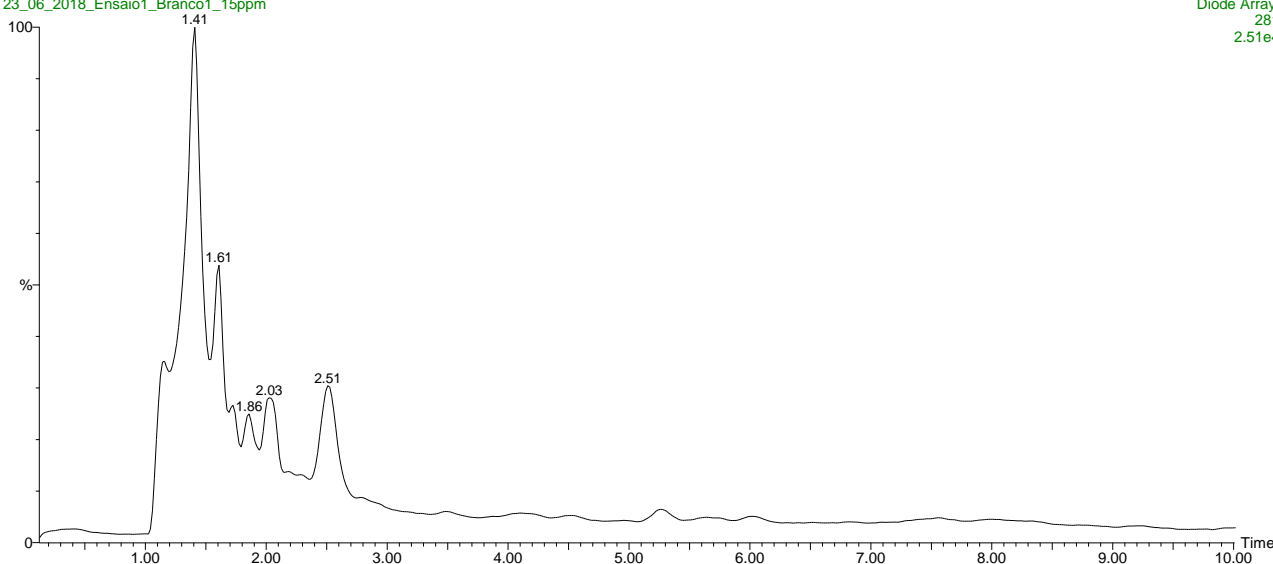


Figura 37 - Amostra do branco, para o ensaio 1, com uma concentração de 15 ppb de PAA.

Anexo VIII – Cromatogramas do Branco do Ensaio 2

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
11_07_2017_Ensaio2_Branco_1ppm

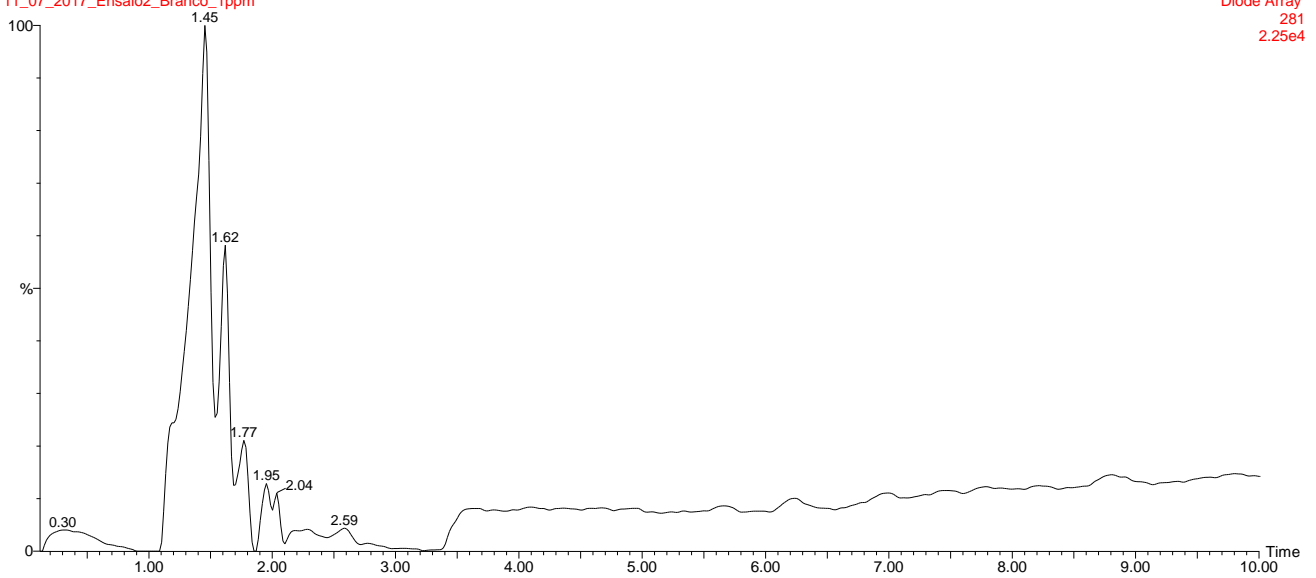


Figura 38- Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 1 ppb de PAA

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
11_07_2017_Ensaio2_Branco_5ppm

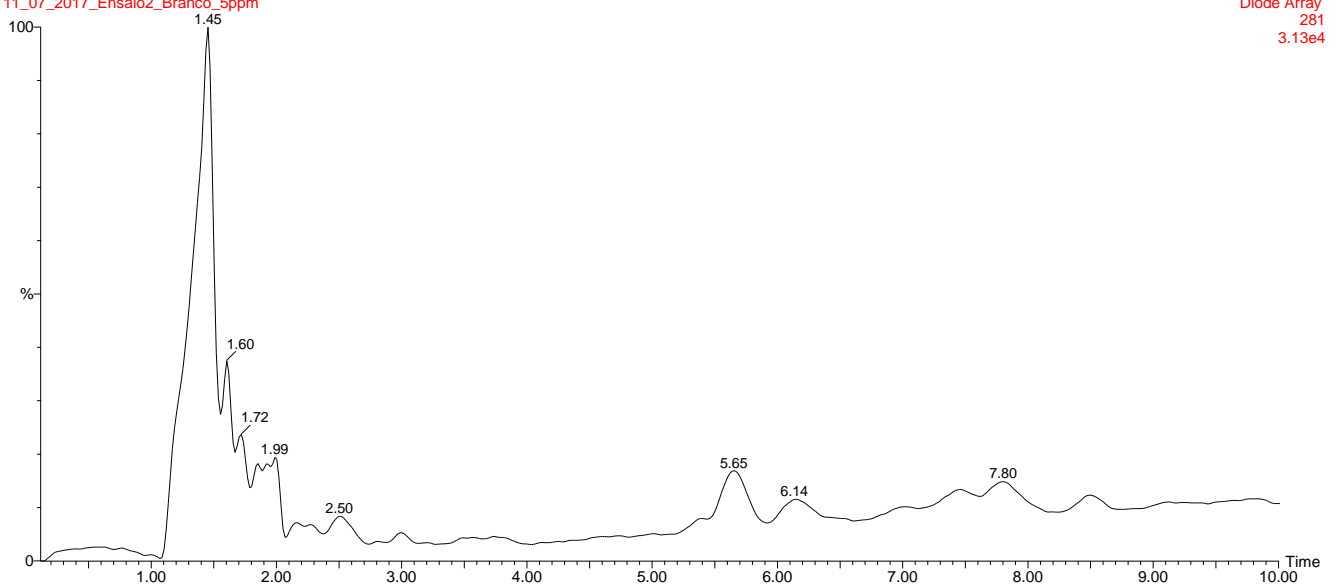
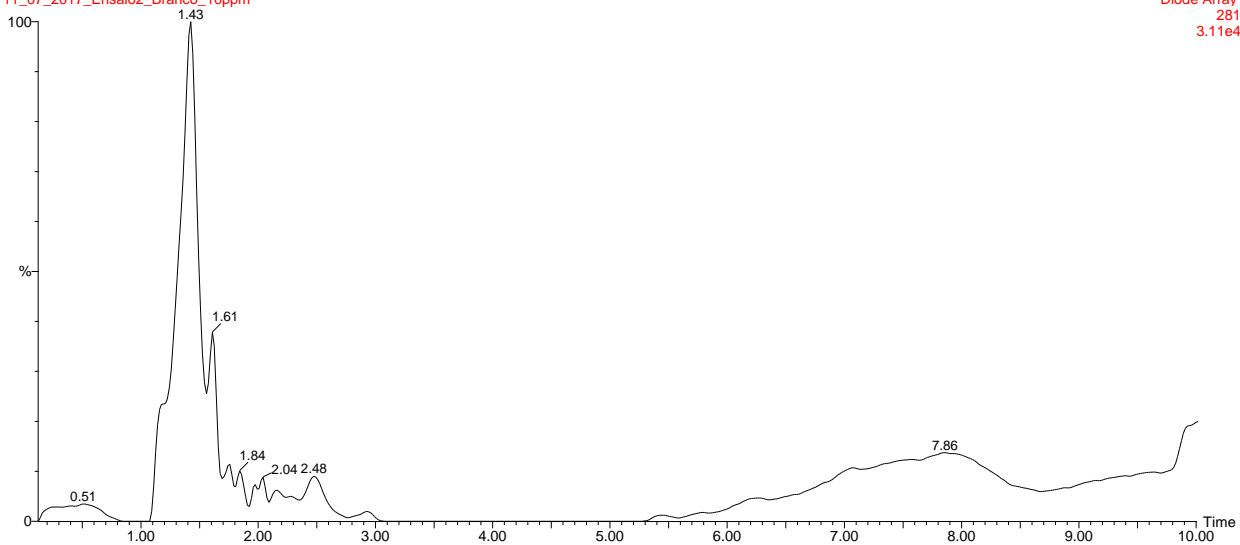


Figura 39 - Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 5 ppb de PAA.

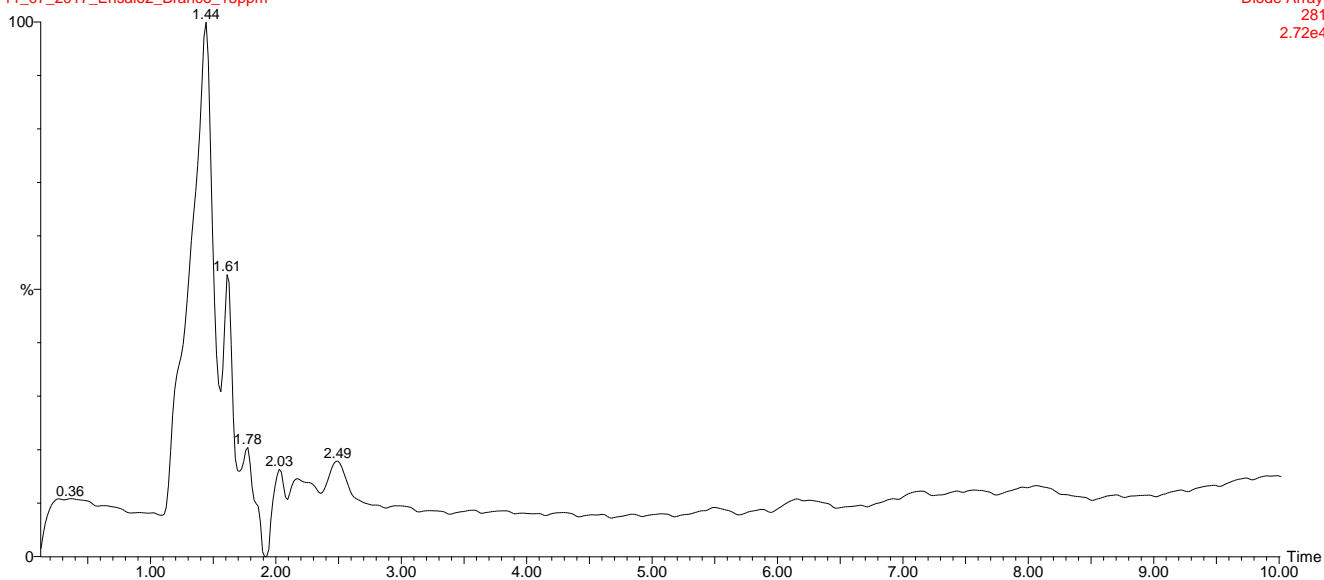
Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
11_07_2017_Ensaio2_Branco_10ppm



Diode Array
281
3.11e4

Figura 40 - Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 15 ppb de PAA.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
11_07_2017_Ensaio2_Branco_15ppm



Diode Array
281
2.72e4

Figura 41 - Amostra do branco, para o ensaio 2, com uma concentração de 15 ppb de PAA.

Anexo IX – Cromatogramas do Branco do Ensaio 3

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

21_07_2017_Ensaio3_Branco_1ppm

Diode Array
281
3.13e4

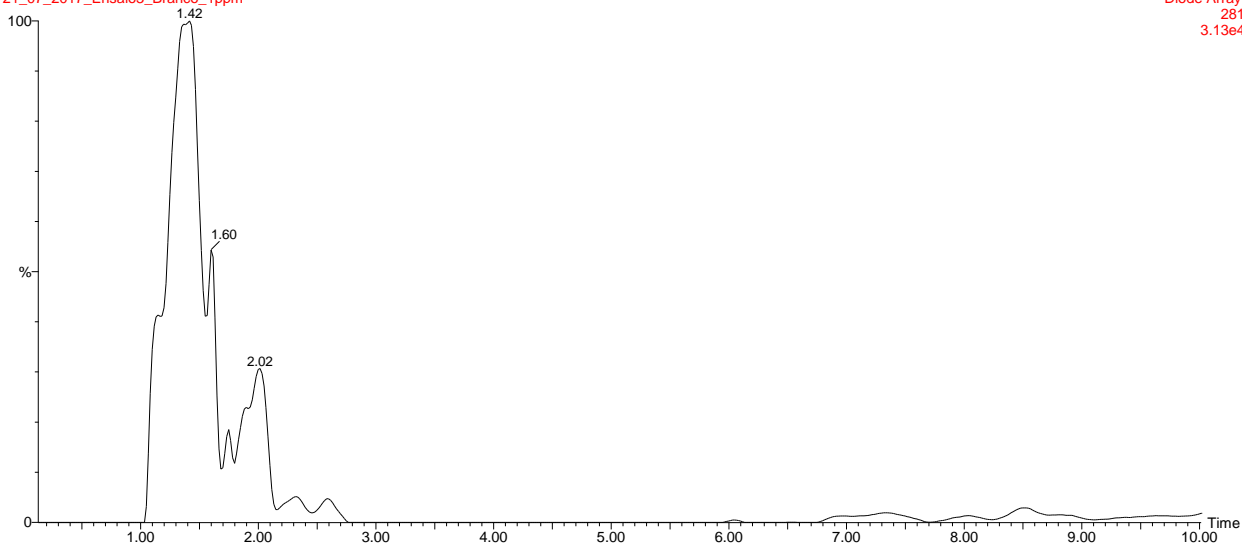


Figura 42- Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 1 ppb de PAA.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

21_07_2017_Ensaio3_Branco_5ppm

Diode Array
281
4.35e4

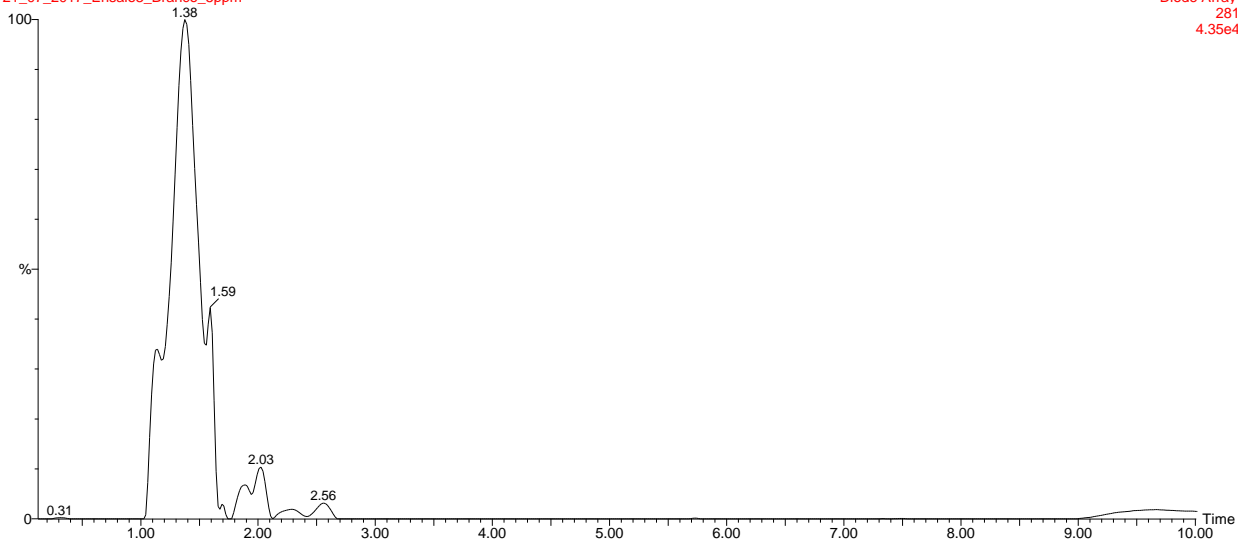


Figura 43 - Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 5 ppb de PAA.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
21_07_2017_Ensaio3_Branco_10ppm

Diode Array
281
2.34e4

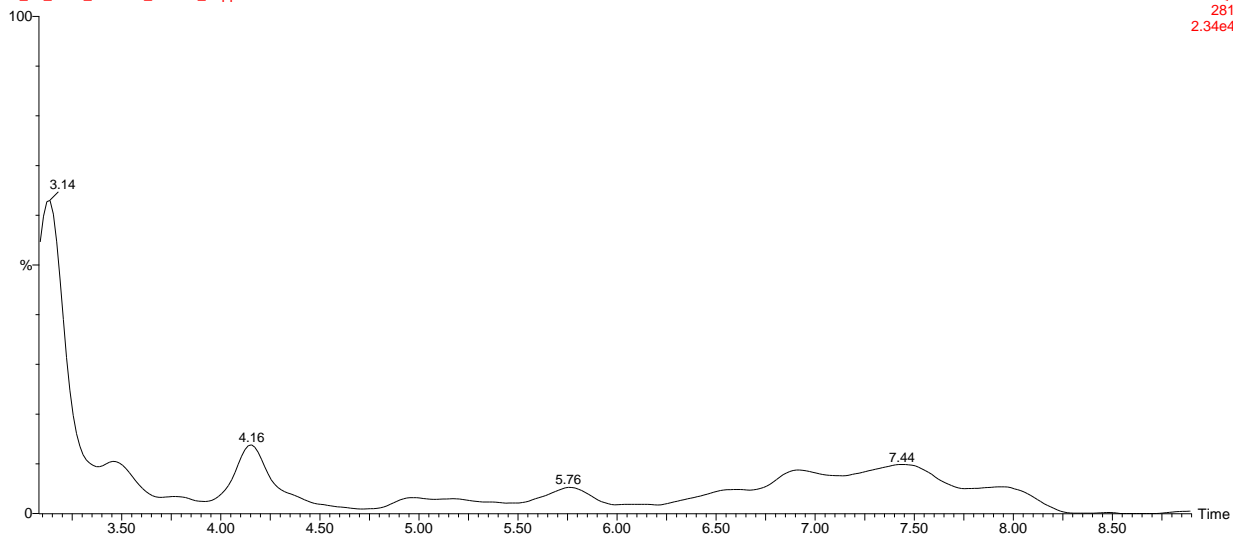


Figura 44 - Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 10 ppb de PAA.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
21_07_2017_Ensaio3_Branco_15ppm

Diode Array
281
3.86e4

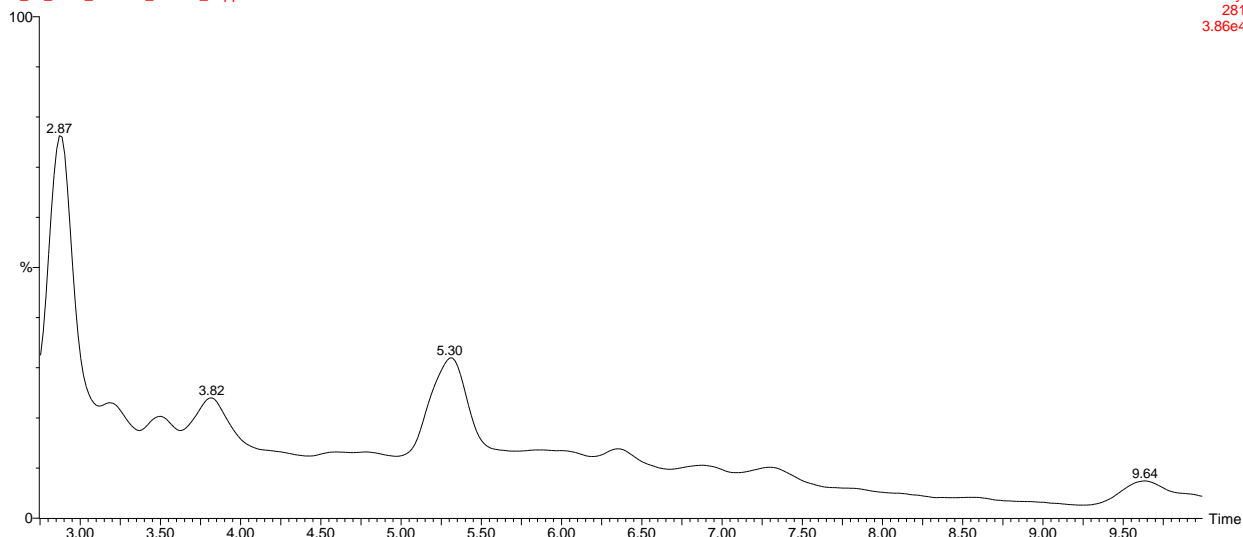


Figura 45 - Amostra do branco, para o ensaio 3, com uma concentração de 15 ppb de PAA.

Anexo X – Cromatogramas do Ensaio 1

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

23_06_2018_Ensaio1_10min_1ppm

Diode Array
281
1.16e5

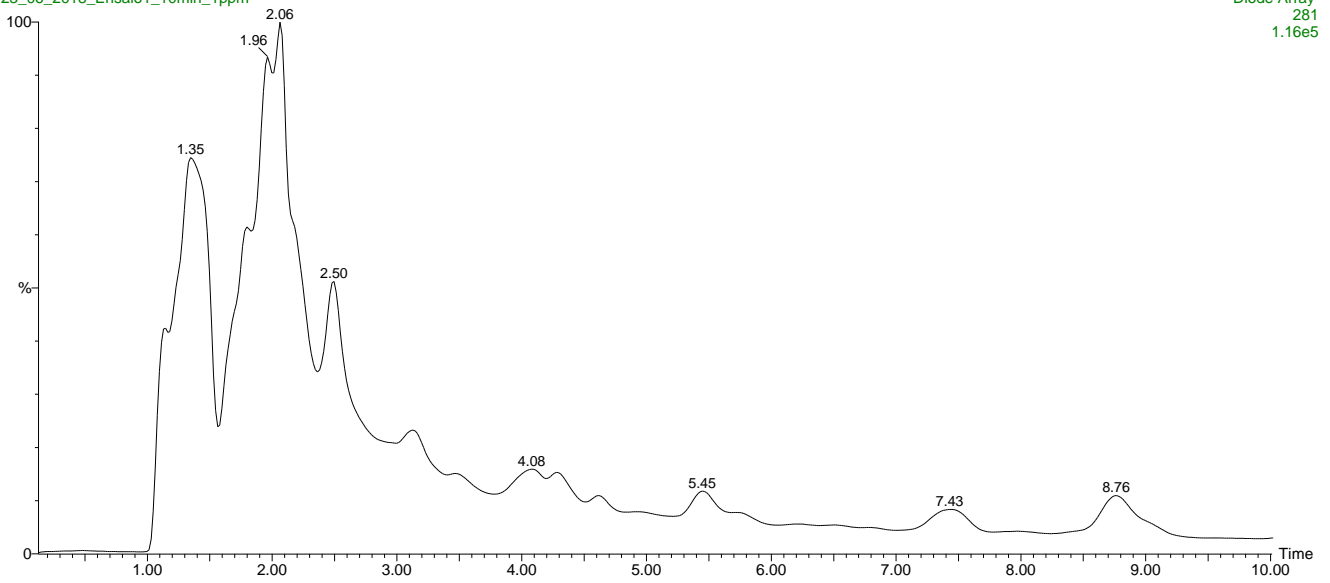


Figura 46 - Concentração de 1 ppb de PAA e 10 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

23_06_2018_Ensaio1_10min_5ppm

Diode Array
281
4.84e4

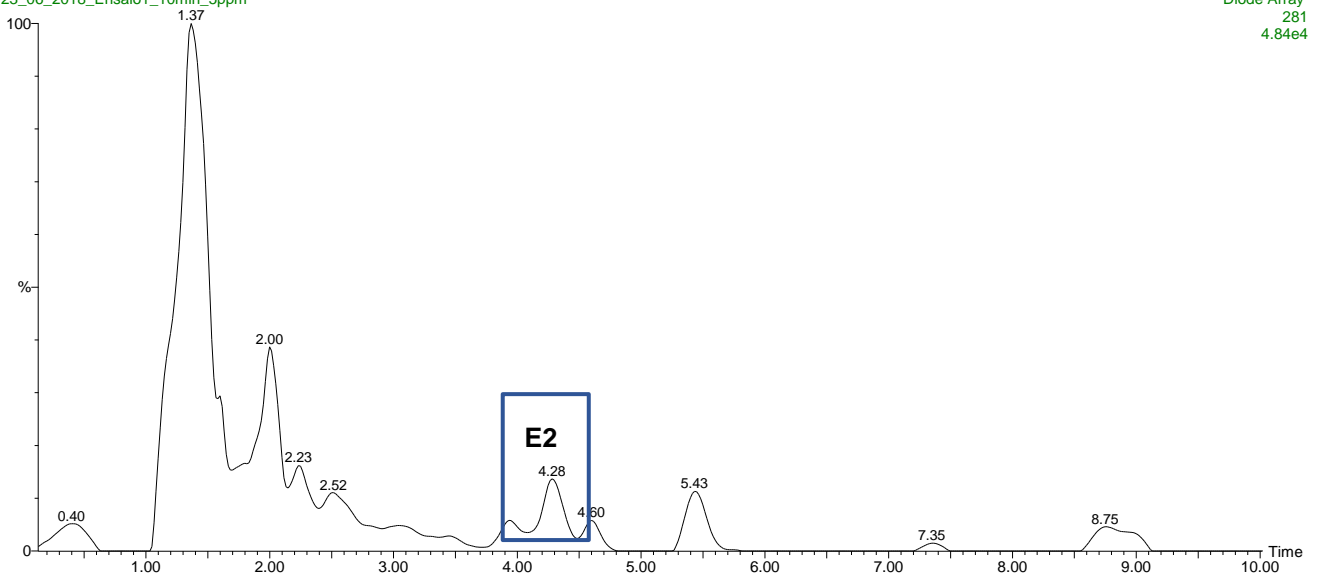


Figura 47 - Concentração de 5 ppb de PAA e 10 min TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
23_06_2018_Ensaio1_10min_10ppm

Diode Array
281
3.92e4

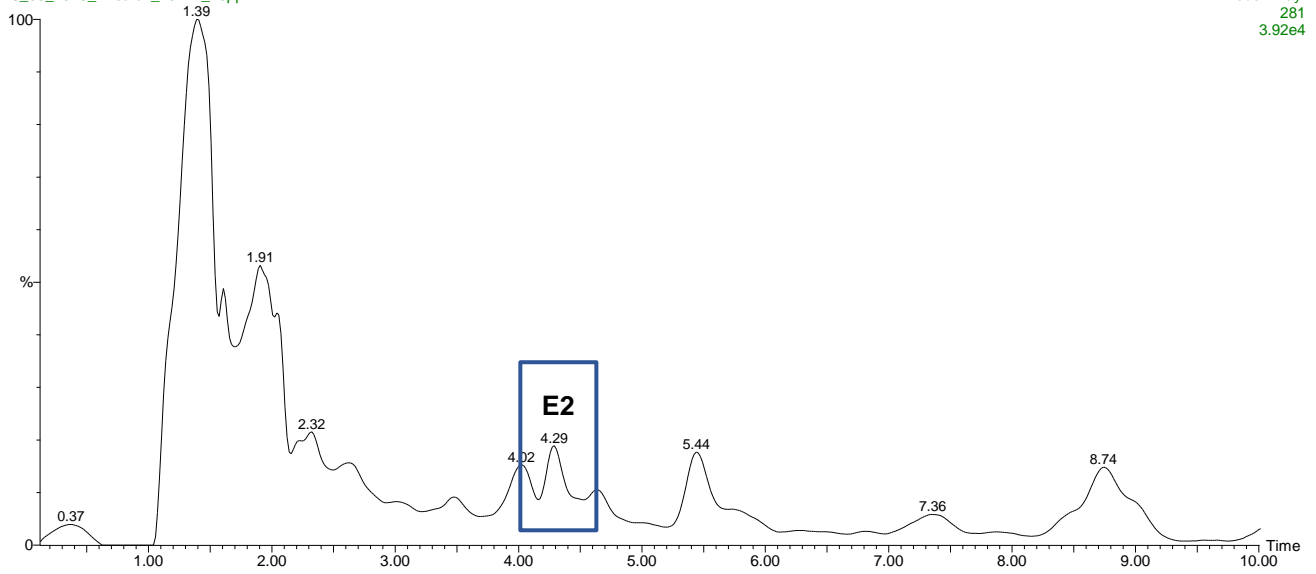


Figura 48 - Concentração de 10 ppb de PAA e 10 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
23_06_2018_Ensaio1_10min_15ppm

Diode Array
281
4.24e4

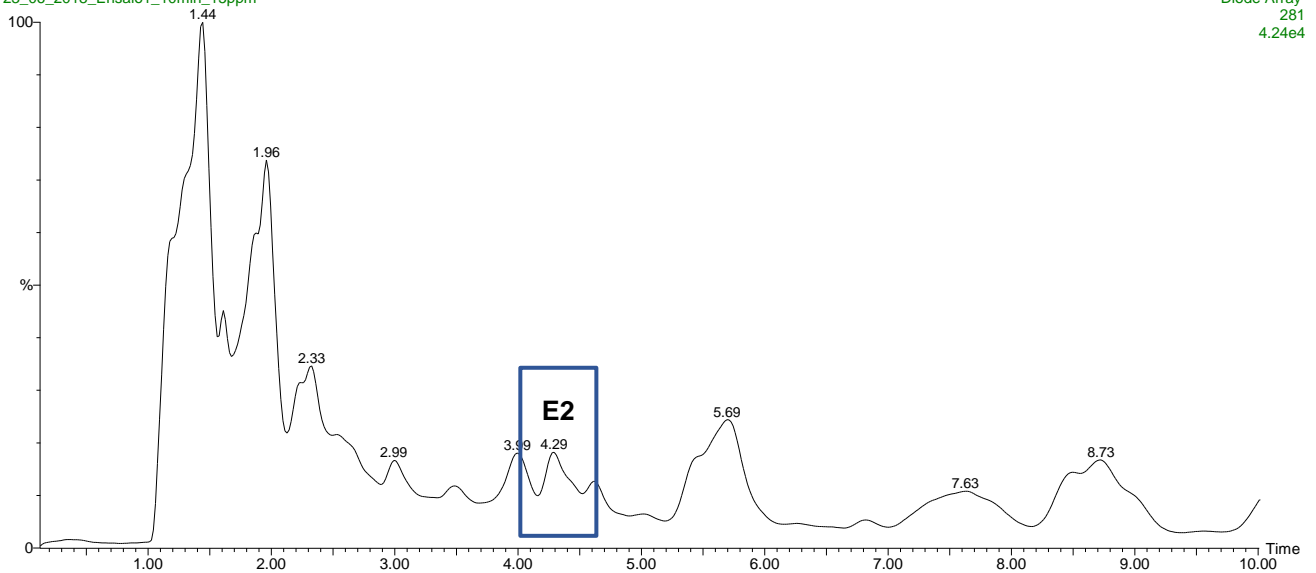


Figura 49 - Concentração de 15 ppb de PAA e 10 min de TC.

Anexo XI – Cromatogramas do Ensaio 2

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

11_07_2017_Ensaio2_15min_1ppm2

Diode Array
281
4.08e4

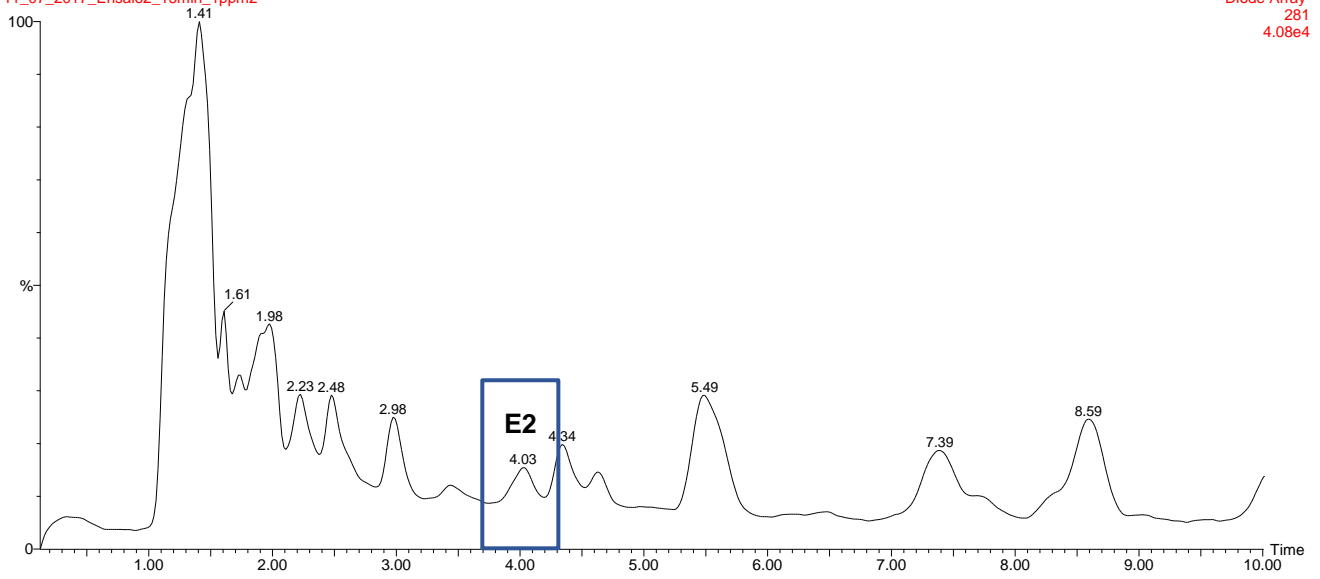


Figura 50 - Concentração de 1 ppb de PAA e 15 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

11_07_2017_Ensaio2_15min_5ppm1

Diode Array
281
5.22e4

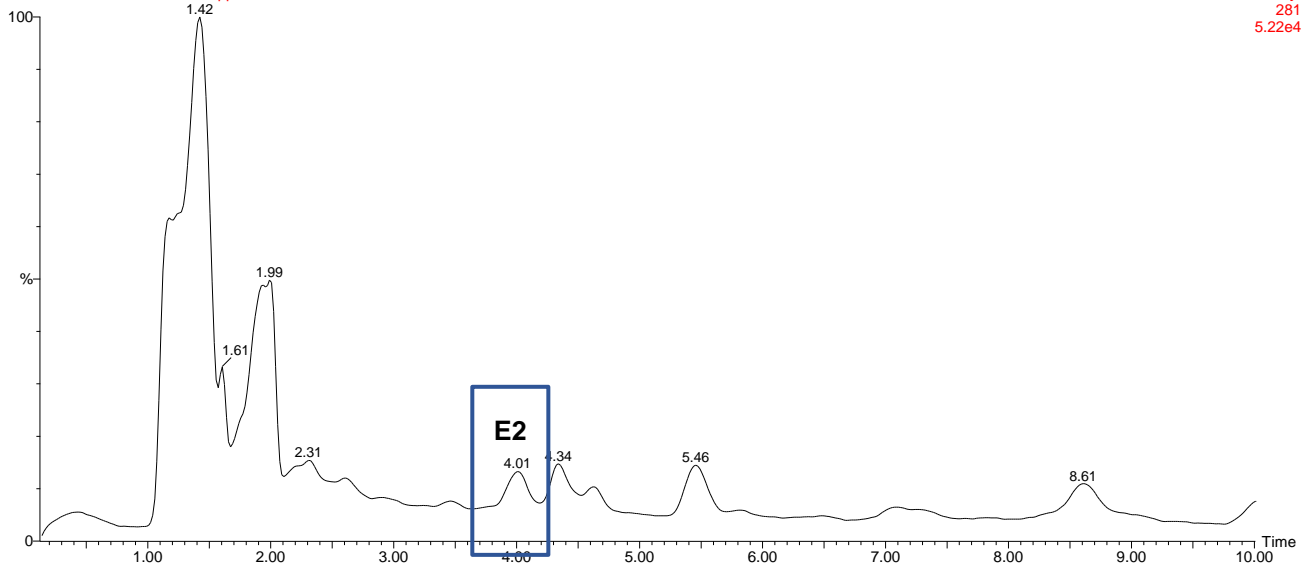


Figura 51 - Concentração de 5 ppb de PAA e 15 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
11_07_2017_Ensaio2_15min_10ppm

Diode Array
281
5.31e4

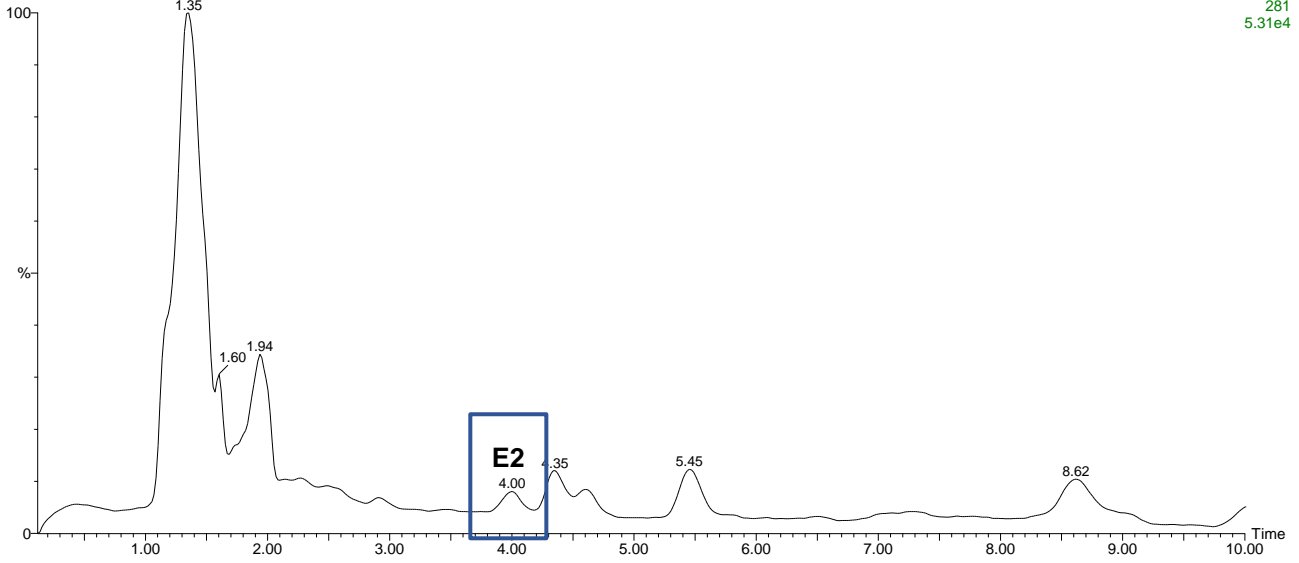


Figura 52 - Concentração de 10 ppb de PAA e 15 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
11_07_2017_Ensaio2_15min_15ppm

Diode Array
281
6.55e4

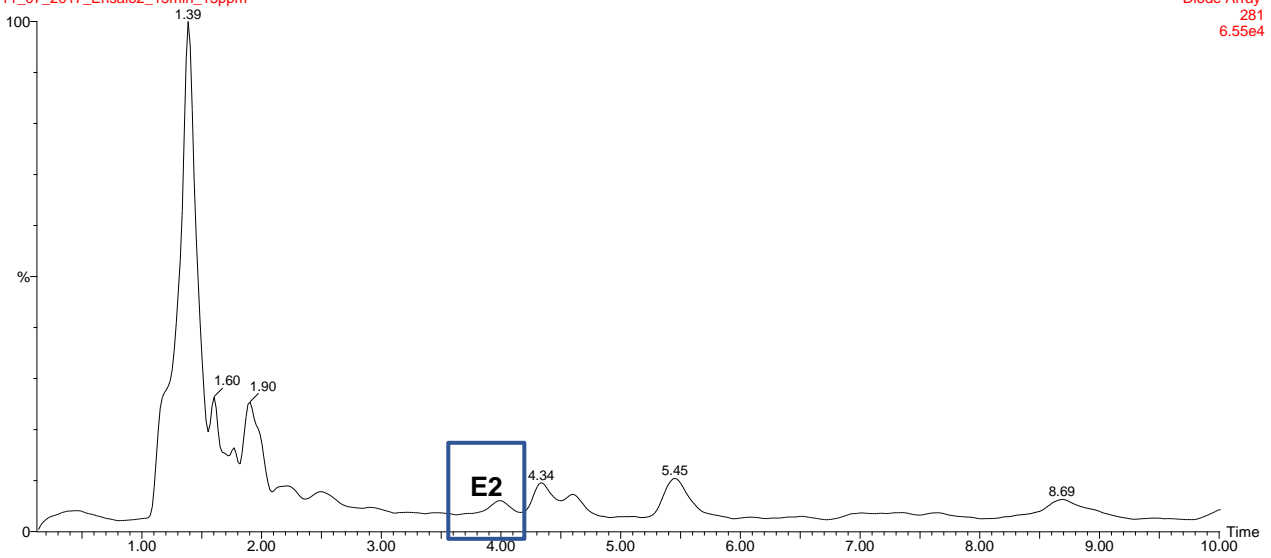


Figura 53 - Concentração de 15 ppb de PAA e 15 min de TC.

Anexo XII – Cromatogramas do Ensaio 3

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

21_07_2017_Ensaio3_20min_1ppm

Diode Array
281
3.97e4

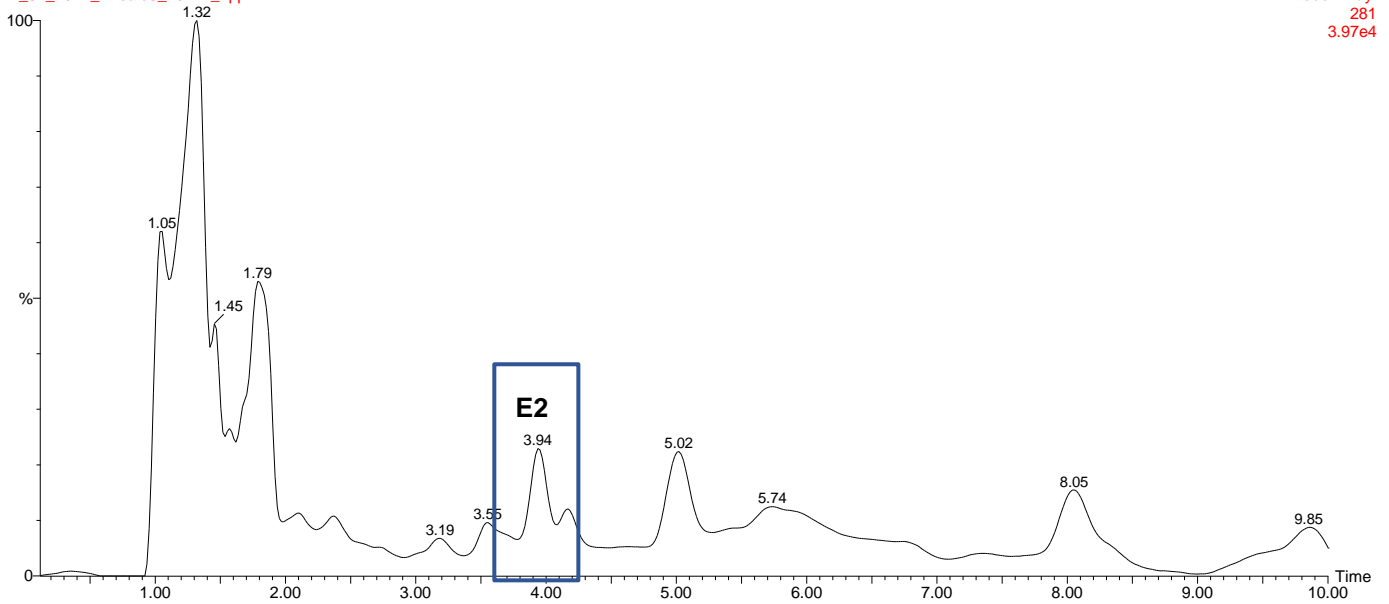


Figura 54 - Concentração de 1 ppb de PAA e 20 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb

21_07_2017_Ensaio3_20min_5ppm

Diode Array
281
3.49e4

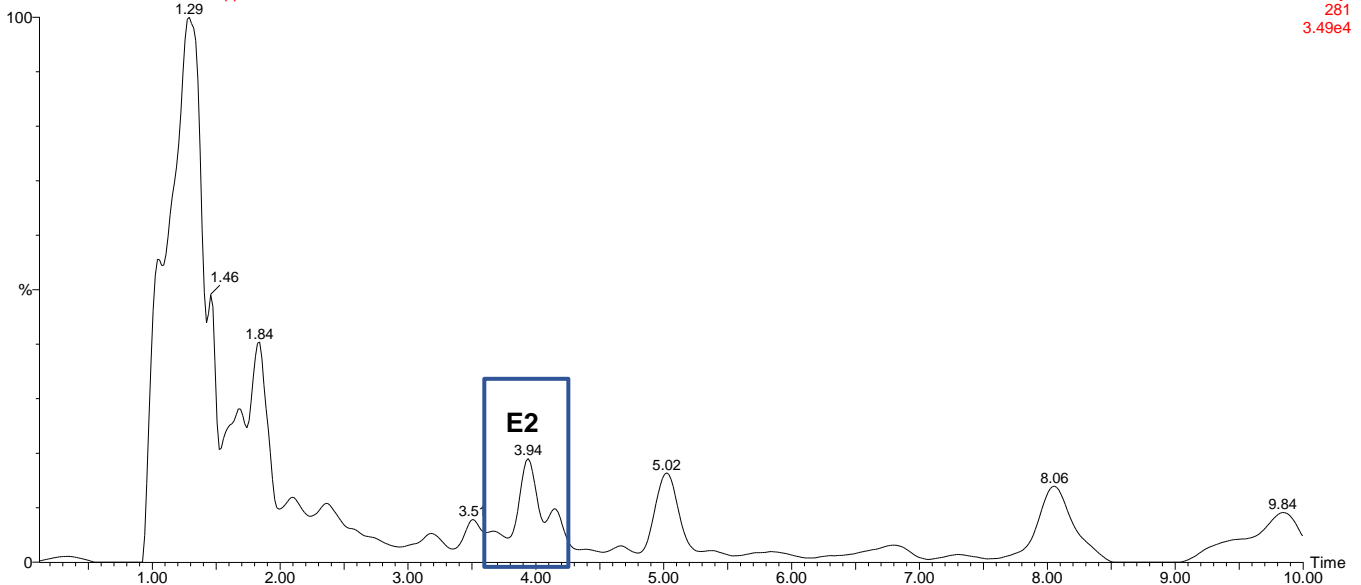


Figura 55 - Concentração de 5 ppb de PAA e 20 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
21_07_2017_Ensaio3_20min_10ppm

Diode Array
281
3.97e4

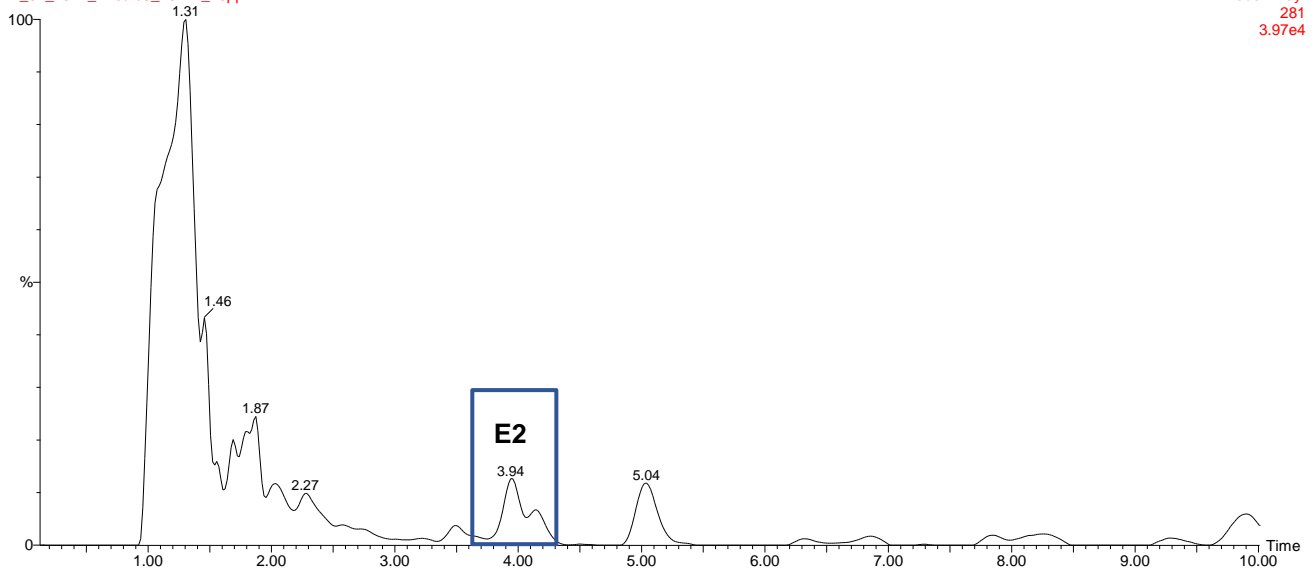


Figura 56 - Concentração de 10 ppb de PAA e 20 min de TC.

Endocrin Disruptors Iso50-50 Kinetex 2.6u XBC18 new Tamb
21_07_2017_Ensaio3_20min_15ppm

Diode Array
281
3.78e4

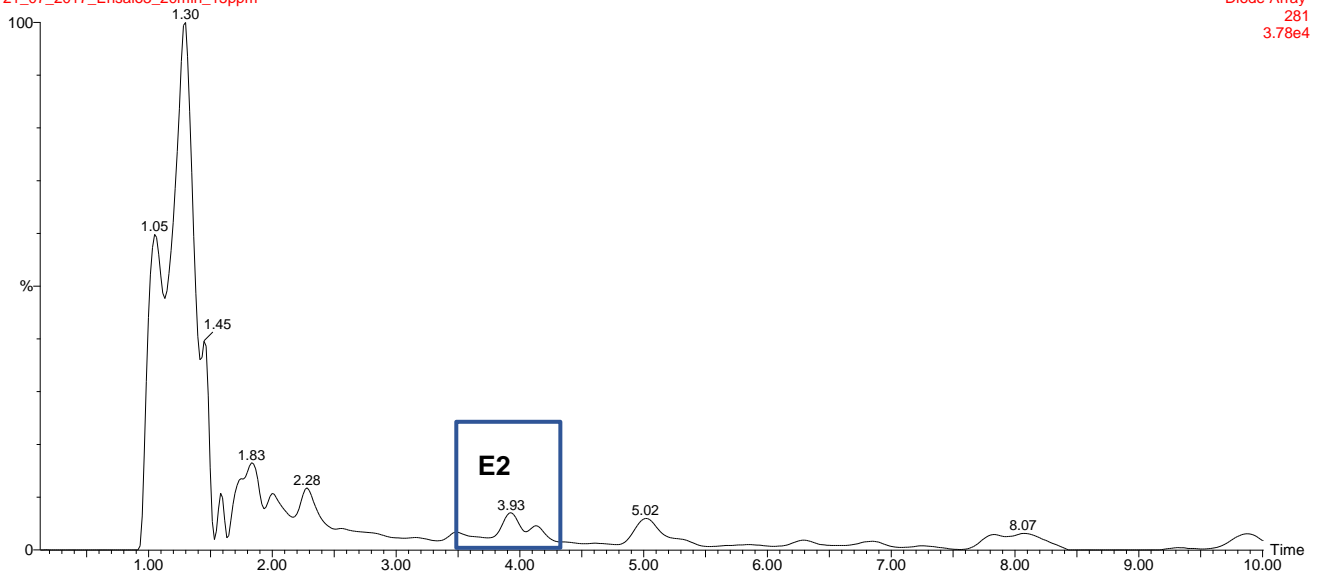


Figura 57 - Concentração de 15 ppb de PAA e 20 min de TC.

Anexo XIII – Protocolo Bradford

Este protocolo foi baseado no documento *Bradford, M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem., 72:248-54.*

1. Preparar 0,5 mL de cada concentração conhecida de standards de proteína BSA. Congelar o restante para próximos ensaios.
 - A concentração em *stock* de proteína de BSA é de 1 mg/mL. Usar água para diluição.
 - Os padrões de proteína BSA utilizados encontram-se na tabela 21.

Tabela 22 - Valores dos padrões de proteína BSA

Padrões de Proteína BSA	0,015
	0,0315
	0,06125
	0,125
	0,25
	0,5
	1
	2

2. Determine how many wells you will need for your assay.
3. Adicionar 180 μ L de solução de Bradford a cada poço;
4. Adicionar 20 μ L de padrão de proteína BSA (para elaboração da curva de calibração) em cada poço, e 20 μ L de amostra nos restantes poços.
5. Determinar a absorvência a 595 nm.

Cálculos:

1. Preparação de uma curva de calibração com recurso aos padrões de BSA, na qual o eixo do XX representa a concentração (mg/mL) e no eixo do YY as absorvências (lidas a 595 nm).

2. Para o cálculo da concentração, deve ser usada a equação da reta obtida no ponto 1. O valor de 'r' deve ser o mais próximo possível de 0,9 ou 1, indicando que os valores são fidedignos. No caso dos últimos dois valores da reta não tenham sofrido um aumento de absorvência de forma linear, então estes não devem ser considerados.
3. No caso de haver diluição, o fator de diluição deve ser multiplicado em cada concentração.
4. Aquando a elaboração dos cálculos, o volume do reagente de Bradford deve ser ignorado, uma vez que todos os poços têm a mesma quantidade de reagente. Deve ser apenas usado o valor da amostra (20 μ L).

Preparação da solução de Bradford

O reagente de Bradford é utilizado para determinar a concentração de proteína de forma expedita. Este reage primariamente com resíduos de arginina, e secundariamente com aminoácidos, que permite a estimativa da concentração de proteína numa amostra bruta.

1. Dissolver 50 mg de Coomassie Blue G250 em 50 mL de metanol.
2. Adicionar 100 mL de H_3PO_4 a 83% à solução do ponto 1;
3. Adicionar a solução do ponto 2 a 500 mL de água, e homogeneizar;
4. Filtrar para remover precipitados;
5. Adicionar 350 mL de água à solução filtrada;
6. Armazenar a uma temperatura de cerca de 4°C;

Anexo XIV – Resultado do Bradford para os cálculos de GST, CAT e VTG

Tabela 23 – Resumo dos resultados obtidos no ensaio do Bradford.

Amostras	Valores Abs		Média	Concentração Proteína (mg/mL)
E2⁽²⁾	1,499		1,50	1,03
E2⁽²⁾	1,448	1,47	1,46	0,82
E2⁽²⁾	1,548	1,47	1,51	1,08
E2⁽¹⁾	0,727	0,73	0,73	0,99
E2⁽¹⁾	0,719	0,72	0,72	0,84
E2 + PAA⁽²⁾	1,558	1,48	1,52	1,13
E2 + PAA⁽²⁾	1,469	1,48	1,48	0,91
E2 + PAA 3⁽²⁾	1,492	1,49	1,49	0,98
E2+PAA⁽¹⁾	0,768	0,76	0,76	1,61
E2+PAA⁽¹⁾	0,728	0,72	0,73	0,92
E2+PAA⁽¹⁾	0,721	0,73	0,73	0,93
PAA⁽²⁾	1,459	1,49	1,48	0,91
PAA⁽²⁾	1,525	1,27	1,53	1,16
PAA⁽²⁾	1,445	1,46	1,45	0,78
PAA⁽¹⁾	0,728	0,72	0,72	0,90
PAA⁽¹⁾	0,725	0,73	0,73	0,94

⁽¹⁾ Valores referentes ao primeiro ensaio realizado em 23 de Out.

⁽²⁾ Valores referentes ao primeiro ensaio realizado em 29 de Nov.

Anexo XV – Características dos objetos de estudo utilizados nos ensaios Ecotoxicológicos (*D. rerio*)

Tabela 24 – Total de peixes utilizados nos dois ensaios.

TOTAIS	
Peixes	22
Machos	13
Fêmeas	9

Tabela 25 – Características dos objetos de estudo em termos de comprimento, sexo e peso.

Ensaio	Amostra	Comprimento (cm)	Sexo	Peso (g)
1º Ensaio	controlo	-	M	-
	c2	-	F	-
	c4	-	F	-
	c1	-	M	-
	c3	-	M	-
	c5	-	F	-
	E2-1	2,6	F	0,3502
	E2-2	2,4	M	0,2104
	E2-3	2,4	M	0,1838
	E2+PAA1	2,5	M	0,3899
	E2+PAA2	2,4	M	0,0887
	E2+PAA3	2,7	M	0,3509
	PAA1	2,2	M	0,2312
	PAA2	2,5	M	0,4101
PAA3	2,1	F	0,2171	
2º Ensaio	E2 1	-	M	1,2016
	E2 2	-	M	1,1396
	E2+PAA 1	-	F	1,3383
	E2+PAA 2	-	F	1,2609
	E2+PAA 3	-	F	1,2154
	PAA 1	-	M	1,0738
	PAA 2	-	F	1,2789



Contribuição para o Estudo da Remoção do Composto 17β-Estradiol de uma Água Residual Urbana Tratada através da adição de Ácido Peracético

Jorge, Joana^a; Maurício, Rita; Noronha, João Paulo; Diniz, Mário

^a Autor correspondente. *Instituição:* Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal.

Email: jp.jorge@campus.fct.unl.pt

Introdução

Devido ao aumento da população a nível mundial, à alteração dos seus hábitos de consumo, e à incapacidade das ETAR na remoção de determinados compostos, aumentou a quantidade e a concentração de micropoluentes nos meios recetores. Nestes compostos têm várias origens, nomeadamente em produtos de higiene pessoal, detergentes ou fármacos. Muitos destes micropoluentes são desreguladores endócrinos, sendo prioritária a sua remoção¹. Estudos anteriores mostraram que foram atingidas remoções quase totais destes compostos, nomeadamente de 17β –estradiol (E2) através da adição de cloro. No entanto, sabe-se também que, quando na presença de matéria orgânica a utilização deste composto pode conduzir à formação de trihalometanos, considerados cancerígenos². Assim, em alternativa, estudou-se a viabilidade da utilização de do Ácido Peracético (PAA), uma vez que este não é conhecida a formação de subprodutos tóxicos³. Avaliou-se ainda a toxicidade e potencial estrogénico da água residual tratada com este oxidante, através de ensaios *in vivo* com Peixes-zebra (*Danio rerio*).

Materiais e Métodos

Para a avaliação da remoção do E2 utilizando PAA, realizaram-se vários ensaios *Jar-Test* com diferentes concentrações de PAA (1, 5, 10 e 15 mg/L) e diferentes tempos de contato (10, 15 e 20 min). A concentração inicial de E2 foi de 50 µg/L. O método de determinação seguiu o método descrito em Fernandes (2016)⁴. Nos ensaios ecotoxicológicos analisou-se a atividade de enzimas de stress oxidativo (Glutathione-S-Transferase e Catalase), bem como os níveis de Vitelogenina (biomarcador de desregulação endócrina) através de ELISA.



Figura 1: Peixe-zebra (*Danio rerio*) em fase adulta. Fonte: DeRose, James. *et al* 2016⁵

Resultados

Tabela 1: Eficiências de remoção de E2, para os diferentes tempos de contato (TC).

Concentração de PAA	TC 10 min	TC 15 min	TC 20 min
	Remoção (%)	Remoção (%)	Remoção (%)
1	90	69	9
5	28	70	41
10	98	71	68
15	59	87	≈100

Tabela 2: Enzima de stress oxidativo Glutathione-S-Transferase.

Amostra	GST (µmol/mL/min)	Actividade específica (nmol/min/mg)
E2	37,06	38,39
E2 + PAA	35,30	35,67
PAA	27,12	29,20

Tabela 3: Enzima de stress oxidativo Catalase.

Amostra	Actividade específica CAT (nmol/min/mg)
E2	31,85
E2+PAA	30,49
PAA	30,11

Tabela 4: Níveis de vitelogenina antes e após a exposição ao analito.

	Machos (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
Controlo (Água + metanol)	ND	ND	ND
Controlo (Água + PAA)	ND	ND	ND
E2	248,9	23,3	
E2+PAA(*)	ND	ND	
	Fêmeas (µg/mL)		
Controlo (Água + metanol)	554,9	14,8	
Controlo (Água + PAA)	437,4	-	
E2	883,4	-	
E2+PAA(*)	-	-	

ND – Non Detected; (*) – No females available

Discussão e Conclusão

A concentração de PAA de 15 mg/L e um tempo de contacto de 20 min foram as condições que permitiram eficiências de remoção de 100%. Relativamente aos ensaios ecotoxicológicos, os resultados mostram não existirem alterações significativas na atividade das enzimas de stress oxidativo. Contudo, houve uma alteração nos níveis de vitelogenina (em particular nos machos), após a exposição ao analito em estudo. Após contato com o Ácido Peracético, os valores de vitelogenina apresentaram valores semelhantes aos valores dos controlos, o que sugere que a ação do PAA remove de forma eficiente o E2 do efluente eliminando assim o potencial estrogénico do mesmo.

Referências: (1) Falconer, R. I. et al (2006). Endocrine-Disrupting Compounds: A review of their challenges to sustainable and safe water supply and reuse. *Environmental Toxicology*, 21:2, pp 181-191. (2) Pereira, O. R. et al (2011). Removal of estrogens through wastewater disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, 82:6, pp 789-799. (3) Luukkonen, T. & Pehkonen S.O (2016). Peracids in water treatment: A critical review. *Critical Review in Environmental Science and Technology*, 47:1, pp1-39. (4) Sandra Fernandes (2016). Contribuição para o estudo da remoção Biológica de 17β-Estradiol em Águas Residuais. Tese de Mestrado. FCT-UNL. (5) DeRose, J. et al (2016) Work more efficiently in developmental Biology with Stereo Microscopy: Zebrafish, Medaka, and Xenopus.

Agradecimentos: Estudo desenvolvido no CENSE, financiado pelo Projeto Estratégico Pest-OE/AMB/UI4085/2013 da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) e financiado pela Valormed.

2018, 13-15 June

**24th International Sustainable
Development Research Society
Conference ACTION FOR A
SUSTAINABLE WORLD: FROM THEORY
TO PRACTICE**

Dear Joana,

You have received this email receipt, as you are listed as one of the co-authors on the submission below. Please take a moment to review the submission.

You can make changes by logging in to your Ex Ordo Dashboard and using the 'Edit' prompt on your My Submissions card (on or before Sunday, 7th January 2018 @ 23:59 Europe/Rome). Further information on how to edit your submission can be found in the article below:

<http://support.exordo.com/article/474-editing-your-submission>

E2 and EE2 removal from wastewater using Peracetic Acid

Rita Maurício (CENSE – Center for Environmental and Sustainability Research, Department of Science and Environmental Engineering, Faculty of Sciences and Technology, NOVA University of Lisbon)

Flavia Semedo (Department of Science and Environmental Engineering, Faculty of Sciences and Technology, NOVA University of Lisbon)

Joana Jorge (Department of Science and Environmental Engineering, Faculty of Sciences and Technology, NOVA University of Lisbon)

Leonor Amaral (CENSE – Center for Environmental and Sustainability Research, Department of Science and Environmental Engineering, Faculty of Sciences and Technology, Universidade NOVA de Lisboa)

Antonio Mano (Department of Science and Environmental Engineering, Faculty of Sciences and Technology, NOVA University of Lisbon)

João Noronha (REQUIMTE - Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Nova University of Lisbon)

Abstract

Endocrine disruptors compounds (EDC) are mostly from anthropogenic source and are characterized by their ability to interfere with the human endocrine system, stimulating functional organism changes and inauspicious effects in their health when exposed to these chemicals. Currently, steroid hormones represent one of the EDC groups with the highest endocrine disruption potential, arising as a concern in terms of environmental effects and consequences to the health of living beings. This group includes natural hormones, for example 17 β -estradiol (E2), and synthetic hormones like 17 α -ethinylestradiol (EE2). Those are mainly excreted through urine and feces, and consequently the wastewater treatment plants are considered the main source of discharge of these compounds. The exposure consequences to E2 and EE2 are described, namely, the feminization of male fish, impact in reproductive function and population decrease. In Human's these consequences are reflected in the increase of breast, prostate, and ovarian cancer, as well as the decrease of sperm and reproductive system malformations. The conventional wastewater treatment plants weren't designed to remove these compounds. Some studies showed that the removal of these types of compounds from wastewaters is possible and achievable using advanced treatments, such as oxidation. Chlorination represents one of the most effective oxidation methods to eliminate E2 and EE2. However, in wastewaters due to the organic matter presence the trihalomethanes formation (extremely carcinogenic) is highly likely. As an alternative to chlorination and other effective existing solutions the use of Peracetic Acid (PAA) was consider. This compound showed to be an efficient option in the disinfection process, and in wastewaters, monitoring studies, after its application, showed that by-products are innocuous and nontoxic. Thus, the main goal of this study was to assess the applicability of PAA in the removal of these estrogenic compounds, E2 and EE2, from wastewaters. To accomplished this study several Jar-test were performed where different PAA concentrations (1, 5, 10 and 15 mg/L) and several contact times (10, 15 and 20 min) were tested. The removal efficiencies obtained varied between 0-100%, depending on the used dosage of PAA and contact time. E2 Removal rates of 100% were obtained with a 15mg/L PAA dosage and 20 min of contact time. For EE2 the same removal rate was achieved with 10 and 15 mg/L PAA dosage and 10 and 15 min of contact time. In a complementary biological assay, it was assessed the toxicity potential of both compounds, and their by-products after the application of PAA, using Zebra fish (*Danio rerio*) as a biological model. In addition, some biological markers (antioxidant enzymes) and endocrine disrupting markers (vitellogenin) were determined. The results showed that the oxidative stress caused by the exposure to E2 and EE2 weren't statistically representative. Although the levels of vitellogenin had increased, confirming their estrogenic potential. It was also showed that EE2 had a higher estrogenic potential than E2. After PAA treatment, the estrogenic potential decreased to levels that were similar to the control assay, revealing the feasibility of the adopted solution.

Topics

6d. Water and sanitation

Other Properties

Presentation Format: Poster

Student Submission: No

Submission ID: 542