



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Hamilton Pires Barbosa Mendes

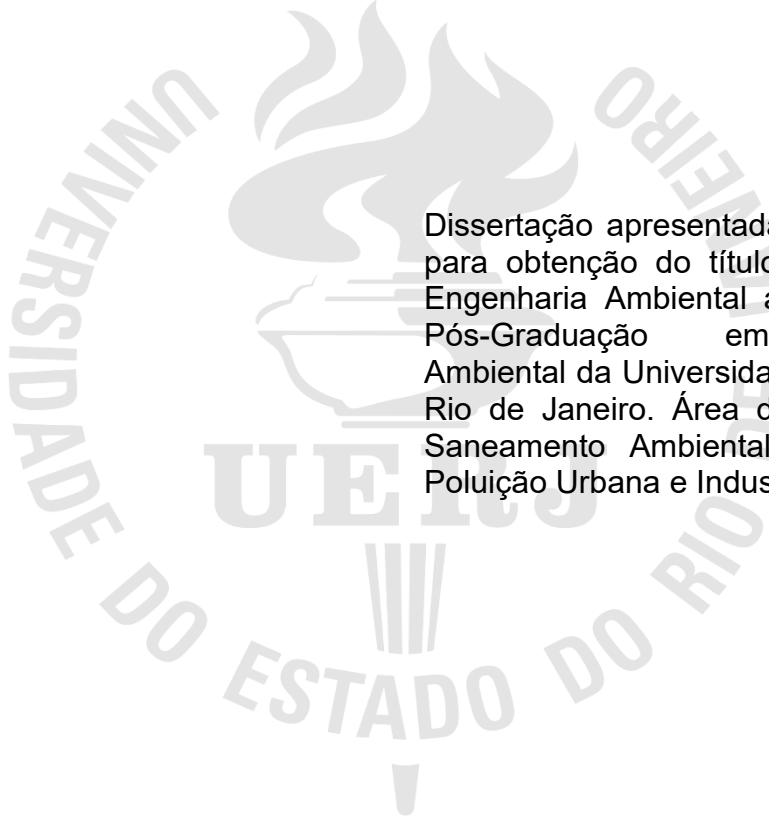
**Biodegradação de hormônios por bactérias com potencial aplicação no
tratamento de efluentes sanitários: revisão sistemática e estudo de
caso**

Rio de Janeiro

2021

Hamilton Pires Barbosa Mendes

Biodegradação de hormônios por bactérias com potencial aplicação no tratamento de efluentes sanitários: revisão sistemática e estudo de caso



Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

M538 Mendes, Hamilton Pires Barbosa.
Biodegradação de hormônios por bactérias com potencial aplicação no tratamento de efluentes sanitários: revisão sistemática e estudo de caso / Hamilton Pires Barbosa Mendes. – 2021.
65f.

Orientadora: Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Poluentes - Teses. 3. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico - Teses. I. Teixeira, Lia Cardoso Rocha Saraiva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. III. Título.

CDU 628.35

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Hamilton Pires Barbosa Mendes

Biodegradação de hormônios por bactérias com potencial aplicação no tratamento de efluentes sanitários: revisão sistemática e estudo de caso

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovada em 18 de junho de 2021.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira (Orientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof^a. Dr^a. Beatriz de Souza Missagia
CEFET-MG

Prof. Dr. André Luís Sá Salomão
Faculdade de Engenharia - UERJ

Rio de Janeiro
2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe e minha avó, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo amor e proteção, pelas lutas que travaram e pelas lições que me ensinaram.

À minha tia Fátima e aos meus irmãos, por sempre estarem ao meu lado, passando por todas as alegrias e dificuldades.

Ao meu pai e toda a minha família pelo incentivo e apoio incondicional que são fundamentais para a minha caminhada.

À minha amada Viviane Krüger pelo apoio emocional e por estar sempre comigo.

À Prof^a. Dr^a. Lia Teixeira por todo apoio e orientação na realização deste projeto tão sonhado.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Leão por todos os ensinamentos sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao grupo e família do Centro de Biologia Experimental Oceanus por todo o apoio.

Aos colegas do LABIFI que foram fundamentais e sempre estiveram à disposição para ajudar.

Aos professores do PEAMB, pelos ensinamentos e inspiração.

Aos colegas da turma do PEAMB.

O sonho é que leva a gente para a frente.
Se a gente for seguir a razão, fica aquietado, acomodado.

Ariano Suassuna, 1927-2014

RESUMO

MENDES, Hamilton Pires Barbosa. **Biodegradação de hormônios por bactérias com potencial aplicação no tratamento de efluentes sanitários: revisão sistemática e estudo de caso.** 2021. 65f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O lançamento de efluentes sanitários em corpos hídricos representa um grande desafio tanto de saúde pública quanto ambiental. Além dos poluentes já conhecidos, um grupo de micropoluentes emergentes tem sido encontrado com frequência tanto em mananciais como em águas já tratadas para consumo humano. Esses compostos micropoluentes, como os estrogênios naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), e estriol (E3) e sintéticos, como o 17 α -etinilestradiol (EE2), são detectados graças à aplicação de técnicas analíticas avançadas. Mesmo em baixas concentrações, esses estrogênios podem interferir e desregular processos importantes do sistema endócrino em humanos e animais. Uma vez desregulado, o sistema endócrino tem o potencial de afetar outros sistemas, tais como nervoso, reprodutor e imunológico. Diante da seriedade desse problema, pesquisadores ao redor do mundo têm buscado desenvolver sistemas eficientes e de baixo custo, capazes de reduzir a concentração destes compostos no efluente tratado. O presente trabalho teve como objetivo revisar na literatura estudos sobre redução de estrogênios por microrganismos em processos de tratamento de efluentes. O trabalho foi dividido em duas etapas sendo, apresentar uma revisão sistemática da literatura científica sobre a degradação de estrogênios por microrganismos em sistemas de tratamento de efluentes, utilizando as palavras-chaves "*hormon biodegradation bacteria*" na base de dados eletrônica Scopus, considerando o período entre os anos 2000 e 2020; e realizar, através de um estudo de caso, ensaios de enriquecimento e isolamento de estirpes bacterianas a partir de amostras de água contaminada com altas concentrações do estrogênio sintético EE2. A busca inicial de artigos resultou em 42 trabalhos, dentre os quais 22 preencheram os critérios de inclusão da revisão. Constatou-se que a China e os Estados Unidos da América são os países com maior representatividade nos estudos sobre a biodegradação de estrogênios em sistemas de tratamento de efluentes. Entre os artigos selecionados, 63% dos ensaios de degradação dos estrogênios naturais reportaram degradação completa e 37% reportaram subprodutos não estrogênicos. Por outro lado, apenas 18% dos estudos sobre a biodegradação do estrogênio sintético EE2 reportaram ausência de estrogenicidade no efluente tratado. No ensaio de enriquecimento e isolamento foram isolados dois tipos de colônias morfológicamente distintas capazes de usar o estrogênio EE2 como fonte de carbono. Dessa forma, os bons resultados reportados sobre a eficiência da degradação de estrogênios podem ser indicadores importantes da existência de condições tecnológicas viáveis para a utilização do tratamento biológico para a remoção de tais substâncias em efluentes sanitários.

Palavras-chave: Micropoluentes emergentes. Desreguladores endócrinos. Tratamento de efluentes. Hormônios estrogênicos. Lodos ativados.

ABSTRACT

MENDES, Hamilton Pires Barbosa. **Biodegradation of hormones by bacteria with potential application in the treatment of sanitary effluents: systematic review and case study.** 2021. 65p. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Sewage discharge into water bodies represents a challenge for both public health and the environment. In addition to the classic environmental pollutants, a group of emerging pollutants have been detected in environmental waters and waters already treated for human consumption. These micropollutant compounds, such as the natural estrogens estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) and estriol (E3) and synthetic ones, such as 17 α -ethinylestradiol (EE2), are detected thanks to the application of advanced analytical techniques. Even at low concentration, these estrogens can interfere and disrupt important endocrine system processes in human and animals. Once deregulated, the endocrine system has the potential to affect other systems, such as the nervous, reproductive, and immune systems. Given the seriousness of this problem, researchers around the world have sought to develop efficient and low-cost systems capable of reducing the concentration of these compounds in the treated effluent. The present work aimed to review in the literature studies on estrogen reduction by microorganisms in effluent treatment processes. The work was divided into two stages, presenting a systematic review of the scientific literature on the degradation of estrogens by microorganisms in effluent treatment systems, using the descriptor "hormone biodegradation bacteria" in the Scopus electronic database, considering the period between years 2000 and 2020; Carry out, through a case study, enrichment tests and isolation of bacterial strains from water samples contaminated with high concentrations of synthetic estrogen EE2. The initial search for articles resulted in 42 works, among which 22 met the review's inclusion criteria. It was found that China and the United States of America are the countries with the greatest representation in studies on the biodegradation of estrogens in effluent treatment systems. Among selected articles, 63% of natural estrogen degradation trials reported complete degradation and 37% reported by-products without estrogenicity. On the other hand, only 18% of studies on the biodegradation of synthetic estrogen EE2 reported an absence of estrogenicity in the treated effluent. In the enrichment and isolation trial, the case study, two types of morphologically distinct colonies capable of using estrogen EE2 as a carbon source were isolated. Thus, the good results reported on the efficiency of estrogen degradation, through biological treatment systems, can be important indicators of the existence of viable technological conditions for the inclusion, in Brazilian environmental legislation, of estrogenicity criteria in treated effluents.

Keywords: Emerging micropollutants. Endocrine disruptors. wastewater treatment. Estrogen hormones. Activated sludge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do E2, EE2, E1 e E3. Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti (2006).	17
Figura 2: Rotas de exposição de micropoluentes no ambiente. Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti (2003).	20
Figura 3: Representação de sistemas de três tipos de sistema <i>wetland</i> construído, classificados com base no tipo de escoamento adotado. Fonte: Brix (1993).	26
Figura 4: Fotobiorreator tubular horizontal semifechado com cultura mista de microalgas e bactérias. 1: Entrada do efluente proveniente da etapa anterior; 2: rodas d'água; 3: direção do fluxo; 4: saída do sistema. Fonte: Vassalle <i>et al.</i> (2020).	28
Figura 5: Vias de degradação bacteriológica do estrogênio natural E2, propostas por Chen <i>et al.</i> (2018).	31
Figura 6: Via de degradação do estrogênio sintético EE2 pela <i>Sphingobacterium</i> sp., proposta por Haiyan <i>et al.</i> (2006).	32
Figura 7: Fases de uma revisão sistemática. Fonte: Adaptado de Galvão e Pereira (2014).	36
Figura 8: Percentual de publicações científicas por continente e país de origem.	38
Figura 9: Percentual de publicações e matriz de origem dos microrganismos usados no processo de degradação dos estrogênios.	39
Figura 10: A – Principais filos bacterianos encontrados nos artigos avaliados. B – Principais classes de bactérias encontradas nos artigos avaliados.	48
Figura 11: Crescimento bacteriano em MM com o EE2 como única fonte de carbono. Fonte: o autor.	51
Figura 12: Crescimento das cepas LBF1 e LBF2 em MM com EE2 como única fonte de carbono.	52
Figura 13: O controle MM: a) com bactéria sem hormônio (MM+cepa). b) com hormônio sem bactérias (MM+EE2 sem cepa). Fonte: o autor.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos em peixes atribuídos aos hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, estrona. Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti (2007).	18
Tabela 2: Excreção diária (μ g) <i>per capita</i> de estrogênios por humanos. Fonte: Adaptado de Johnson et al. (2000).....	18
Tabela 3: Concentrações afluentes e efluentes de estrogênios em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus índices de redução (%). Fonte: Adaptado de Pessoa, (2012).	19
Tabela 4: Diferenças entre a revisão narrativa e a revisão sistemática. Fonte: Adaptado de Rother (2007).	35
Tabela 5: Estudos sobre degradação de diferentes concentrações de E1 pelas bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Sphingomonas</i> e por consórcio microbiológico.	41
Tabela 6: Pesquisas sobre a degradação de diferentes concentrações de E2 por bactérias isoladas e em consórcio.....	44
Tabela 7: Pesquisas sobre a degradação de diferentes concentrações de EE2 pelas bactérias do gênero <i>Acinetobacter</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Hyphomicrobium sp</i> <i>Sphingobacterium sp.</i> e por consórcio microbiológico.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAS	Biofiltro aerado submerso
BEM	Biorreator de membrana
CA	Carvão ativado
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DDE	2,2-bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEs	Desreguladores endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DO	Densidade ótica
E1	Eestrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FAS	Filtro aerado submerso
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HRAP	High-rate algal ponds
Kbio	Constante de biodegradação
Kow	Coefficiente de partição octanol-água
LABIFI	Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Águas e Efluentes
MCF-7	Célula Michigan Cancer Foudation-7
MeEE2	Mestranol
MM	Meio mineral
NSF	U.S. National Science Foundation
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBR	Fotobiorreatores tubulares horizontais
PCB	Bifenilas policloradas
POA	Processos oxidativos avançados

SAO	Separadores de água e óleo
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
VTG	Vitelogenina
WC	<i>Wetlands</i> construídos
YES	Yeast Estrogen Screen

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 OBJETIVOS	15
1.1 Objetivo geral	15
1.2 Objetivos específicos	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Micropoluentes Emergentes	16
2.1.1 Origem e classificação	16
2.1.2 Legislação aplicada aos desreguladores endócrinos	20
2.2 Tratamento de efluentes sanitários	21
2.2.1 Tratamento Preliminar	21
2.2.2 Tratamento Primário	22
2.2.3 Tratamento Secundário	22
2.2.4 Tratamento Terciário	23
2.3 Redução de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de efluentes	23
2.3.1 Redução de desreguladores endócrinos em wetlands construídos	25
2.3.2 Redução de desreguladores endócrinos em tanques de microalgas	27
2.3.3 Etapas de redução e remoção dos estrogênios	29
2.4 Bioprospecção e biotecnologia no processo de biorremediação	33
3 REVISÃO SISTEMÁTICA	35
3.1 Metodologia	36
3.1.1 Pergunta da Pesquisa	36
3.1.2 Método de Busca	36
3.1.3 Seleção de Artigos	37
3.1.4 Síntese dos dados	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Discussão da revisão sistemática	38
5 EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO	49
5.1 Obtenção das amostras e meio de cultura	49
5.2 Enriquecimento e isolamento das cepas bacterianas	49
5.3 EE2 como fonte de carbono	51

6	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO

O lançamento de efluentes em corpos hídricos, sem o devido tratamento, tem consequências graves tanto para o equilíbrio ecológico como para a saúde humana. Dentre os diversos poluentes, os micropoluentes desreguladores endócrinos (DEs) têm um lugar de destaque devido à capacidade de interferir nos processos hormonais, bloqueando ou mimetizando as ações destes. Além disso, esses compostos têm o potencial de causar efeitos adversos à saúde humana e animal mesmo em concentrações extremamente baixas entre 0.1 e 1 ng.L⁻¹ (PAUWELS, 2008). Segundo Salomão (2014), em humanos, a exposição diária aos DEs ocorre por via da ingestão de alimentos e água, inalação de gases e partículas presentes no ar e através da pele. Esses compostos exógenos estão divididos em classes, dentre as quais estão os hormônios estrogênicos naturais e os artificiais (BILA e DEZOTTI, 2007).

Os estrogênios naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3) e o estrogênio artificial 17 α -etinilestradiol (EE2) são os principais responsáveis pelos efeitos desreguladores observados em corpos hídricos que recebem despejo de efluentes (HOMKLIN *et al.*, 2011; BILA e DEZOTTI, 2007; OMS, 2012). Esses estrogênios, naturais e sintéticos, são excretados por humanos e animais na forma ativa e como conjugados, principalmente glicuronídeos (E2) e sulfatos (E1 e EE2) (HANSELMAR *et al.*, 2003). Apesar de apresentarem baixo potencial estrogênico na forma de conjugado, estes são facilmente dissociados para a forma mais ativa por processos químicos ou enzimáticos (DUONG *et al.*, 2011). Na saída das estações de tratamento de efluentes (ETEs) os estrogênios estão predominantemente na forma ativa, o que indica que a dissociação dos conjugados ocorre majoritariamente entre a excreção e o lançamento do efluente (GOMES *et al.*, 2009).

Os estrogênios presentes em efluentes podem ser removidos ou transformados através da atividade microbiológica em sistemas como lodo ativado (CHANG *et al.* 2009), *wetlands* construído (RABELLO *et al.* 2019) e sistema de microalgas (LAI *et al.*, 2002). A degradação dos estrogênios através de processos microbiológicos também pode ser observada nos ecossistemas naturais tais como rios (JURGENS *et al.* 2002), sedimento marinho (HOMKLIN *et al.*, 2011) e em solos (FAN *et al.*, 2007). Apesar de ser um processo pouco adotado, quando comparado aos processos de

oxidação avançada, carvão ativado e membranas, a biodegradação dos estrogênios é uma alternativa eficiente e de menor impacto ambiental. Nesse processo são criadas condições para que bactérias, fungos ou vegetais removam, reduzam ou modifiquem os estrogênios (VILELA, 2012).

A biodegradação de estrogênios tem sido assunto de estudos nacionais e internacionais. Alguns microrganismos como bactérias (FUJII *et al.*, 2002), fungos (LIU *et al.*, 2017) e microalgas (POLLIO *et al.*, 1994) têm a capacidade de degradar os estrogênios E1, E2, E3 e EE2. Além disso, Yang et al. (2016) observaram que algumas bactérias conseguem degradar completamente estes estrogênios e seus subprodutos (YANG *et al.*, 2016).

Este trabalho fez, por meio de uma revisão sistemática, um levantamento da produção bibliográfica científica dos últimos 20 anos a respeito da degradação de estrogênios naturais e sintéticos por microrganismos, principalmente bactérias. Além disso, por meio da técnica de isolamento em meio mineral mínimo, avaliou a presença de bactérias degradadoras de EE2 em amostras provenientes de um rio urbano poluído por esgoto sanitário, onde foram quantificadas concentrações elevadas de EE2.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão sistemática sobre a adoção de processos microbiológicos na degradação de hormônios em efluentes sanitários, além de isolar, a partir de amostras de água de um rio urbano contaminado pelo despejo contínuo de efluente sanitário, bactérias capazes de crescer utilizando o EE2 como única fonte de carbono.

1.2 Objetivos específicos

- Fazer um levantamento bibliográfico nos últimos vinte anos sobre a utilização de microrganismos para a degradação de hormônios, usando a base de dado Scopus;
- Avaliar, a partir da revisão sistemática, o potencial de biodegradação de bactérias isoladas de diferentes matrizes ambientais para a degradação de hormônios;
- Isolar bactérias degradadoras do hormônio EE2, usando a técnica de isolamento e enriquecimento em meio mineral mínimo, a partir de um rio urbano com histórico de contaminação por este hormônio;
- Avaliar em laboratório a curva de crescimento das bactérias isoladas utilizando o EE2 como única fonte de carbono.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Micropoluentes Emergentes

2.1.1 Origem e classificação

Os avanços tecnológicos têm permitido o desenvolvimento de uma grande variedade de novos produtos como fármacos, pesticidas, plastificantes, produtos de limpeza, produtos de higiene pessoal, entre outros. Com isso, devido ao consumo desenfreado e descarte inadequado de resíduos e efluentes, novas substâncias provenientes desses produtos chegam diariamente ao ar, solo e aos corpos hídricos (DAUGHTON, 2013). Nessas substâncias são encontrados compostos que podem ter o potencial de causar efeitos adversos aos ecossistemas e à saúde humana mesmo em concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L . Portanto, a detecção e quantificação desses compostos, nessas concentrações, só foi possível devido ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas extremamente sensíveis, por esta razão, esses micropoluentes são denominados micropoluentes emergentes (BILA e DEZOTTI, 2007). Dentro deste grupo, destacam-se os compostos desreguladores endócrinos (DEs) que são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios que têm papel fundamental na manutenção, desenvolvimento, reprodução e comportamento dos organismos (USEPA, 1997).

Os compostos DEs podem ser de origem sintética ou natural. Estes são agrupados em quatro classes: a) Substâncias sintéticas utilizadas na agricultura e seus subprodutos como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; b) Substâncias sintéticas utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, dioxinas, bifenilas policloradas (PCBs), alquilfenóis e seus subprodutos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), ftalatos, bisfenol A, entre outros; c) Substâncias naturais, como os fitoestrogênios – genisteína e metaresinol e os estrogênios naturais estrona (E1), 17β -estradiol (E2) e estriol (E3); e d) Compostos farmacêuticos, como o dietilestilbestrol (DES) e o 17α -etinilestradiol (EE2) (BILA e DEZOTTI, 2007). Devido à quantidade despejada continuamente nos corpos hídricos e melhor conformação para ligação com os receptores estrogênicos, os estrogênios naturais E1, E2, E3 e o sintético EE2

geram impacto ambiental mesmo em concentrações extremamente baixas (BARCELÓ, 2013 *apud* CHAVES, 2016).

As moléculas dos estrogênios possuem um esqueleto comum denominado ciclopentanoperidro-fenantreno e são biossintetizados a partir do colesterol. A estrutura básica consiste em três anéis hexagonais e um anel pentagonal (Figura 1). O anel fenólico, o qual forma o ácido 3-hidroxila, é responsável pela transmissão da informação biológica por meio da realização de pontes de hidrogênio com o receptor estrogênico. Diante da relevância do anel fenólico para a propagação do efeito biológico, os sistemas de tratamento de efluentes devem promover a remoção completa desses compostos ou promover a destruição deste anel (LOPES e MOURA, 2008).

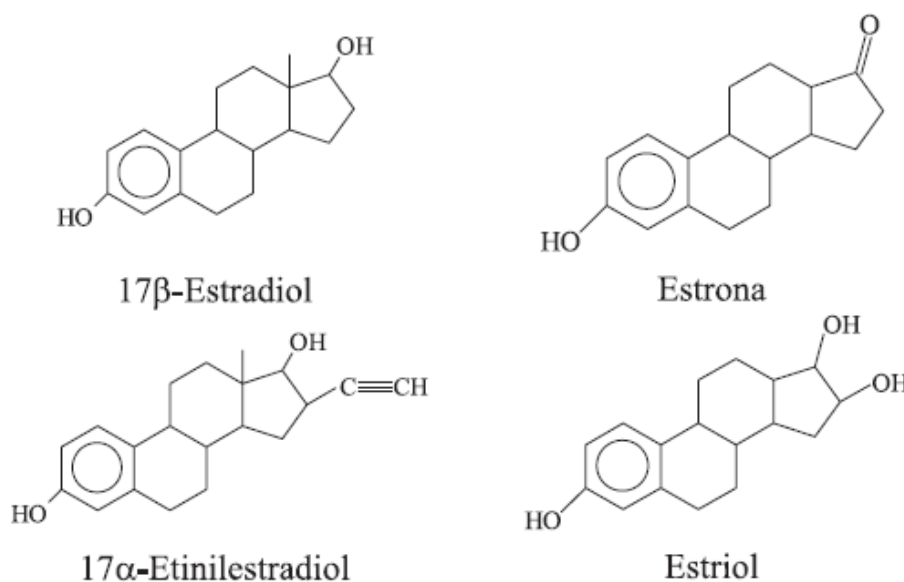


Figura 1: Estrutura química do E2, EE2, E1 e E3. Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti (2006).

A comprovação dos efeitos desreguladores desses compostos tem sido reportada há muito tempo, por exemplo, o estudo desenvolvido pelo Departamento de Pesca do Canadá, em 1957, observou que muitos peixes da área norte da Ilha de Vancouver tinham sintomas de cegueira devido a exposição ao pesticida sintético diclorodifeniltricloroetano (DDT) (CARSON, 1962 *apud* SANCHEZ, 2008). Em um estudo sobre DEs, Purdom *et al.* (1994) observaram que o E2 e outros estrogênios naturais, presentes no efluente sanitário de ETEs no Reino Unido, causaram a feminilização de peixes machos. Bila e Dezotti (2003) elencaram alguns efeitos

observados em peixes atribuídos à exposição aos estrogênios E1, E2 e EE2 (Tabela 1).

Hormônio	Efeito
EE2	Indução da síntese de vitelogenina (VTG)
	Mortalidade da espécie
	Declínio na reprodução
E2	Feminização de peixes
	Alteração nas gônadas
	Hermafroditismo
	Incidência de testículo-óvulos nas gônadas
	Declínio na reprodução
	Inibição do crescimento testicular
	Mortalidade elevada dos descendentes
E1	Indução da síntese de vitelogenina (VTG)
	Inibição do crescimento testicular

Tabela 1: Efeitos em peixes atribuídos aos hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, estrona. Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti (2007).

Johnson *et al.* (2000) avaliaram as quantidades diárias excretadas dos estrogênios naturais E1, E2, E3 e a quantidade de EE2 nas pílulas orais contraceptivas e estimaram as excreções diárias de estrogênios por humanos (Tabela 2). As ETEs convencionais em operação, de forma geral, não são projetadas especificamente para reduzir ou transformar estrogênios em compostos não estrogênicos (LUO *et al.*, 2014) (Tabela 3).

Categoria	E1 ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	E2 ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	E3 ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	EE2 ($\mu\text{g}/\text{dia}$)
Homens	3,9	1,6	1,5	-
Mulheres menstruando	8	3,5	4,8	-
Mulheres menopausa	4	2,3	1	-
Mulheres grávidas	600	259	6000	-
Mulheres que usam contraceptivos	-	-	-	35

Tabela 2: Excreção diária (μg) *per capita* de estrogênios por humanos. Fonte: Adaptado de Johnson *et al.* (2000).

País	Referência	Sistema de tratamento	E1 (ng/L)			E2 (ng/L)			EE2 (ng/L)		
			Afl.	Efl.	%Rem	Afl.	Efl.	%Rem.	Afl.	Efl.	%Rem
Itália	Boronti et al., 2000	Lodo Ativado	52	21	61	12	1	87	3	0,45	85
Alemanha	Johnson et al., 2000	Lodo Ativado	31	24	23	9,69	4	59	4,84	1,4	71
Brasil	Ghiselle et al., 2006	Lodo Ativado	4830	4130	14,5	6690	5560	16,9	5810	5040	13,3
Inglaterra	Kanda e Churchley, 2008	Lodo Ativado	44,7	1,22	97,3	2,9	0,23	99,2	0,65	0,63	3,2

Tabela 3: Concentrações afluentes e efluentes de estrogênios em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus índices de redução (%). Fonte: Adaptado de Pessoa, (2012).

Segundo Santos *et al.* (2010), a via mais provável para a contaminação dos corpos hídricos por estrogênios é através da excreção pela urina e fezes e chegam por meio de esgotos sanitários, assim como esgotos industriais. Os resíduos excretados pelo gado, suínos e outros animais também são fontes potenciais de E1, E2 e E3 (KHANAL *et al.*, 2006). A proximidade entre os rios, lagos e aquíferos que recebem esses micropoluentes com os mananciais de captação de água podem afetar a qualidade da água potável (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). As principais rotas de exposição dos diferentes tipos de micropoluentes no ambiente podem ser visualizadas na Figura 2. Entretanto, mundialmente, as legislações relacionadas à concentração de estrogênios nos efluentes e na água potável ainda não estão consolidadas.

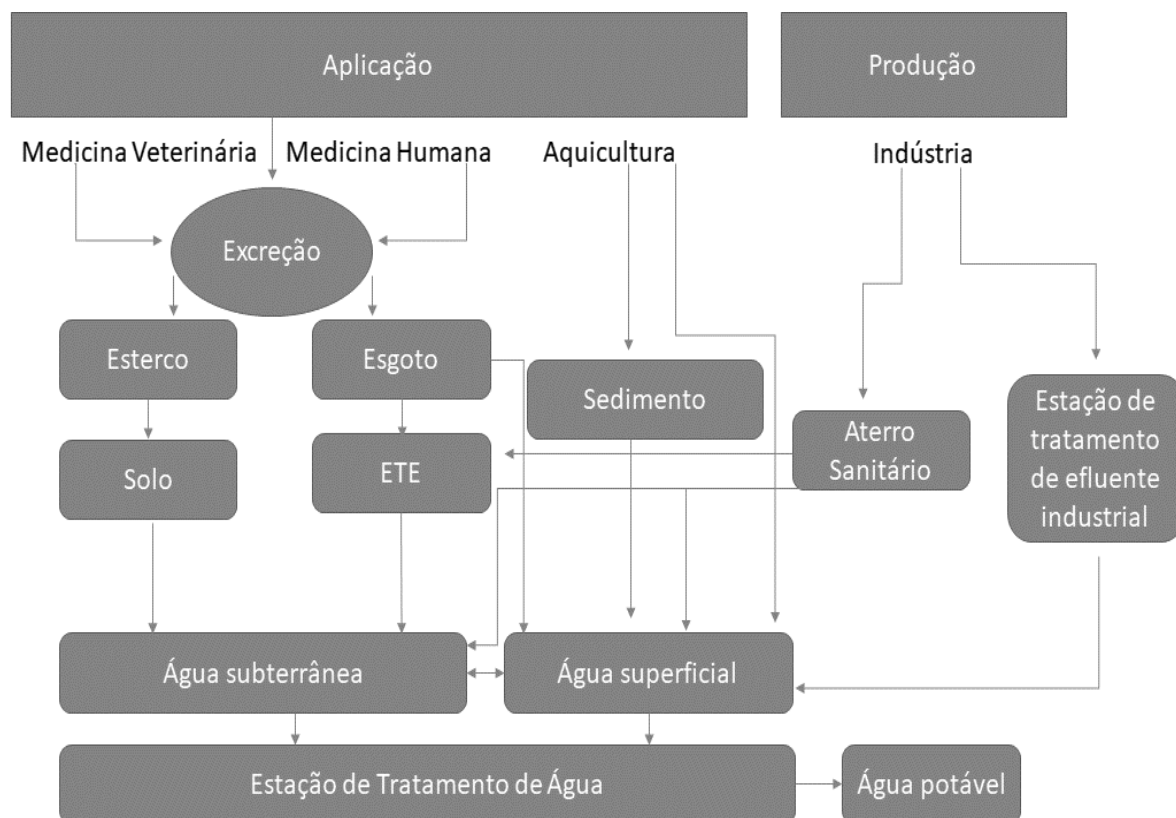


Figura 2: Rotas de exposição de micropoluentes no ambiente. Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti (2003).

2.1.2 Legislação aplicada aos desreguladores endócrinos

O avanço do conhecimento sobre os impactos dos estrogênios exógenos na saúde humana e no equilíbrio ecológico, reforça a necessidade urgente da definição de diretrizes para o gerenciamento de efluentes estrogênicos. A elaboração e implementação dessas normas depende do esforço conjunto da sociedade e das autoridades públicas. Além disso, fatores como a complexidade metodológica necessária para a detecção desses compostos tornam o processo ainda mais desafiador (CHAVES, 2016).

No contexto mundial, alguns países da Europa, América do Norte e a Austrália estão na vanguarda da adoção de diretrizes específicas para os estrogênios. Como exemplo, a Comissão Europeia sugere para águas superficiais, como lagoas e rios, o limite de 0.035 ng/L para EE2 e 0.4 ng/L para E2 (EUROPEAN COMMISSION, 2012 *apud* BERNARDELLI, 2014).

No Brasil, mesmo após a alteração recente da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5 de 28 de setembro de 2017 pela Portaria GM/MS nº 888 de 4 de maio de 2021, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, a legislação em vigor não estabelece limites para a concentração de estrogênios. Em relação aos corpos hídricos e ao lançamento de efluentes, a resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005 – que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento – complementada pela Resolução Conama 430, de 13 de maio de 2011 – que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes – não apresenta diretrizes sobre limites para a concentração de estrogênios em efluentes.

2.2 Tratamento de efluentes sanitários

As ETEs convencionais visam promover o enquadramento dos efluentes nos limites das legislações vigentes através de etapas de gradeamento, sedimentação, floculação e precipitação. Segundo Von Sperling (1996), o tratamento de efluente sanitário é usualmente classificado como preliminar, primário, secundário e terciário.

2.2.1 Tratamento Preliminar

O tratamento preliminar dos efluentes tem como objetivo remover sólidos grosseiros, areia e óleos e graxas livres (GIORDANO, 1999). Essa remoção visa proteger os dispositivos do sistema de tratamento tais como bombas, tubulações, peças, raspadores, além de remover parcialmente a carga poluidora, contribuindo para melhorar o desempenho das unidades subsequentes do tratamento (VON SPERLING, 2005).

2.2.2 *Tratamento Primário*

O objetivo principal dessa etapa é a redução dos sólidos sedimentáveis e sólidos flutuantes (VON SPERLING, 1996). Nessa etapa, as partículas em suspensão, compostas tanto por sólidos orgânicos como por sólidos inorgânicos, sedimentam através da ação da gravidade (JORDÃO e PESSÔA, 2011). O efluente sanitário flui em baixa velocidade através do centro do decantador, permitindo que os sólidos em suspensão, sedimentem gradualmente (JORDÃO e PESSÔA, 2011). Nessa etapa são removidos normalmente componentes tóxicos (excesso de detergentes, corantes, amidas), matéria orgânica, gorduras e metais pesados dissolvidos (GIORDANO, 1999). A redução desses sólidos garante uma redução inicial da carga de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que é encaminhada para o tratamento secundário, onde a redução da matéria orgânica é mais efetiva (VON SPERLING, 2005).

2.2.3 *Tratamento Secundário*

No tratamento secundário, os principais agentes são os microrganismos aeróbios, anaeróbios e os facultativos (RECESA, 2008). Nesse processo a matéria orgânica dissolvida ou em suspensão é utilizada como substrato para microrganismos tais como bactérias, fungos e protozoários, que a transformam em gases, água e novos microrganismos (GIORDANO, 2004). Nessa etapa, além da redução da matéria carbonácea, pode ocorrer também a redução de matéria nitrogenada (VON SPERLING, 2012). Os processos biológicos de tratamento reproduzem em escala de tempo e área os fenômenos de autodepuração que ocorrem na natureza (GIORDANO, 2004). Os processos aeróbios são usualmente representados por lodos ativados de aeração prolongada, lodos ativados convencionais, lagoas aeradas facultativas e aeróbias (GIORDANO, 2004). Os sistemas que utilizam filtros biológicos, biodiscos, biocontactores e as lagoas fotossintéticas são representantes dos processos facultativos. Por fim, os processos biológicos anaeróbios ocorrem em lagoas anaeróbias e biodigestores (GIORDANO, 2004).

2.2.4 Tratamento Terciário

O tratamento terciário de efluentes destina-se à melhoria da qualidade dos efluentes tratados pela remoção de cor residual; turbidez (redução de coloides, metais pesados, nitrogênio, fósforo, compostos orgânicos refratários aos níveis de tratamento anteriores); e desinfecção (GIORDANO, 2004). A escolha do método de tratamento terciário depende do uso potencial do efluente tratado, da natureza do esgoto (doméstico ou industrial), da compatibilidade das várias operações e processos, da disponibilidade de meios de disposição dos contaminantes finais, da viabilidade ambiental e econômica de cada método (TCHOBANOGLIOUS, 1991). Segundo Chang *et al.* (2009), nessa etapa os DEs são removidos ou reduzidos de forma eficiente. Entretanto estes autores afirmam que o processo de redução adequado para um DE tem que ser cuidadosamente selecionado, levando-se em conta suas características, sua concentração e suas diferentes propriedades físicas e químicas.

2.3 Redução de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de efluentes

A complexidade para a degradação de compostos, como os micropoluentes DEs, é um fator que dificulta o controle e favorece a disseminação desses nos corpos hídricos (CHAVES, 2016). Dentre os processos biológicos aplicados em sistemas convencionais, o tratamento secundário através de lodos ativados é o que tem maior eficiência na redução de estrogênios (AQUINO *et al.* 2013).

O sistema de lodos ativados consiste na oxidação bioquímica da matéria orgânica e inorgânica, presente no efluente, através de uma população microbiana mantida em suspensão sob condições aeróbias (METCALF e EDDY, 2003). Nesse processo, os microrganismos usam o O_2 e o NO_3^-N como receptores de elétrons durante a produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) (HERNANDEZ, 2012). Desta forma, os microrganismos transformam os compostos orgânicos em CO_2 , H_2O , NH_4^+ , SO_4 e novas células (MARAIS e EKAMA, 1975). As partes integrantes de um processo de lodo ativado, segundo Von Sperling (2002), são: reator biológico – parte onde acontece a degradação da matéria orgânica pelos microrganismos; sistema de aeração – fornece o oxigênio necessário para a manutenção das

condições aeróbias; decantador secundário – ocorre a sedimentação dos flocos biológicos formados no reator biológico. Apesar de ser um processo que reduz a concentração de DEs no efluente, nos lodos ativados nem todos os compostos são completamente degradados ou convertidos (BOLONG *et al.*, 2009). A redução destes compostos requer a aplicação de tratamento complementar além do tratamento convencional (YANG *et al.*, 2017).

Entre as opções de sistemas complementares existentes para reduzir ou remover estrogênios, destacam-se a adsorção em carvão ativado (CA), os processos oxidativos avançados (POA), os processos de filtração por membranas e a biodegradação (YANG *et al.*, 2017). Cada um desses processos apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas antes da sua adoção. O CA, embora apresente elevada eficiência de redução dos DEs, requer troca ou regeneração constante do carvão e aumenta consideravelmente o volume de resíduo gerado durante o processo de tratamento (BRANDÃO; SILVA, 2006). A utilização dos POA apresenta elevada eficiência de redução dos DEs, mas a oxidação química pode gerar subprodutos potencialmente mais tóxicos que os próprios compostos orgânicos (WESTERHOFF *et al.*, 2005). A utilização de membranas é extremamente eficiente para a remoção desses compostos, porém, existe o alto consumo de energia e necessidade de troca das membranas (YOON *et al.*, 2006). Entretanto, estas tecnologias são caras e requerem operação especializada, por isso não são normalmente aplicadas em ETEs públicas (DORDIO *et al.* 2010). Por fim, a biodegradação tem sido considerada uma opção de baixo custo, bem como de transformação de hormônios estrogênicos em produtos inofensivos (HASAN *et al.*, 2011).

Tendo em vista as informações acima expostas, fica evidente a necessidade de adotar alternativas eficientes para o tratamento de efluentes. Com isso, sistemas de baixo custo como *wetlands* construídos e tanques de microalgas têm sido intensamente estudados e já apresentaram resultados promissores em relação a redução ou transformação de DEs em compostos não estrogênicos (VASSALLE *et al.*, 2020).

2.3.1 Redução de desreguladores endócrinos em wetlands construídos

Os *wetlands* construídos (WC) são sistemas artificiais que também são conhecidos como filtros plantados com macrófitas, filtros de areia plantados, zonas úmidas construídas, leitos plantados, banhados biológicos construídos, leitos construídos e alagados construídos (ARAÚJO, 2018). São processos que procuram imitar o que acontece em áreas naturalmente alagadas. Desta forma, o uso de plantas aquáticas fixas em substratos propicia a formação de biofilmes, que são compostos por uma variedade de microrganismos, localizados principalmente nas raízes dessas plantas (ARAÚJO, 2018).

Os WC podem ser classificados de acordo com o escoamento utilizado em três tipos básicos: fluxo superficial, fluxo subsuperficial horizontal ou vertical (Figura 3) (VYMAZAL; KROEPFELOVÁ, 2008). Os componentes básicos de um WC são: Substrato – pode ser composto por areia, silte, cascalho, brita, resíduos inertes de mineração e além de resíduos orgânicos que permitem o escoamento do efluente e formação do biofilme (MARQUES, 1999; SALATI JR. *et al.*, 1999); Macrófitas aquáticas – espécies nativas que cresçam em locais constantemente alagados (JOLY, 1998). As espécies mais usadas são as dos gêneros *Typha*, *Juncos*, *Carex*, *Phragmites* e *Heliconia* (ARAÚJO, 2018); Biofilme – Esse filme biológico é composto por colônias de bactérias, protozoários e outros microrganismos que degradam a matéria orgânica tornando os nutrientes disponíveis para as macrófitas (MARQUES, 1999).

As plantas eliminam os DEs por meio da absorção direta, ou por criarem condições adequadas aos microrganismos que degradam esses compostos (COLLINS; FRYER; GROSSO, 2006). A redução ou transformação de DEs em compostos não estrogênicos se dá graças aos mecanismos físicos, químicos e biológicos que ocorrem próximo às plantas e raízes pertencentes a esse ecossistema (DE WILT *et al.* 2016; SONG *et al.* 2009 *apud* REBELLO *et al.*, 2019).

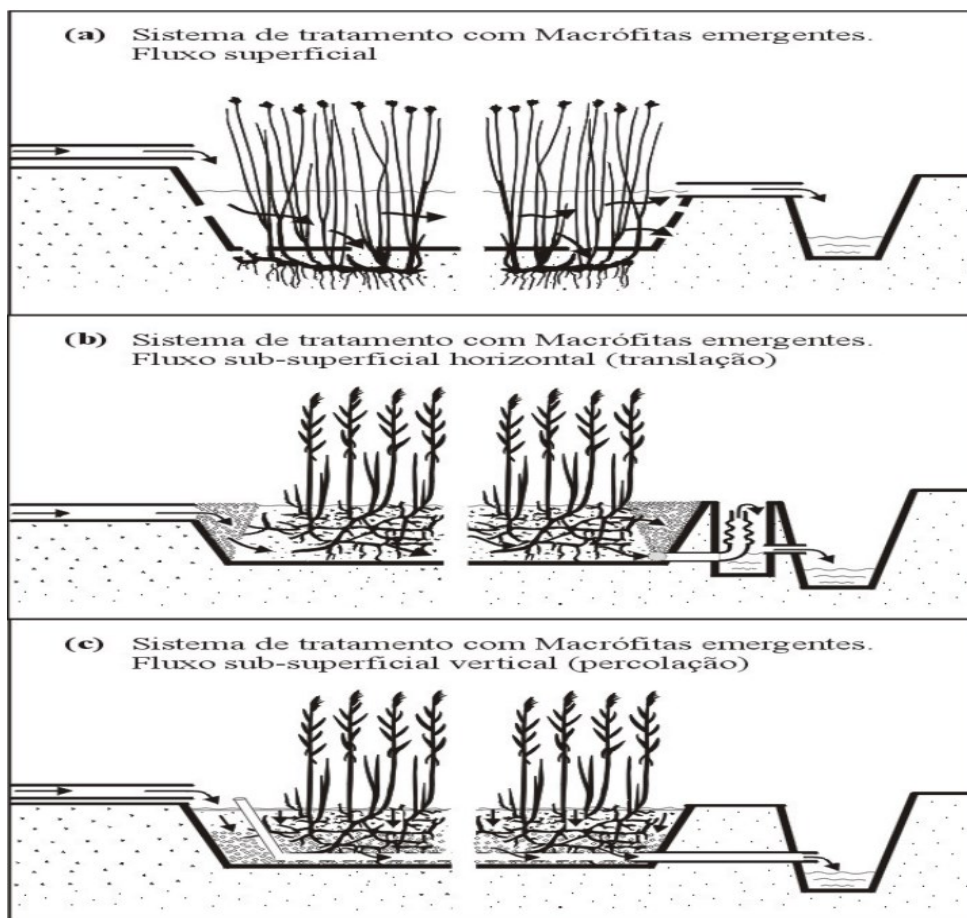


Figura 3: Representação de sistemas de três tipos de sistema *wetland* construído, classificados com base no tipo de escoamento adotado. Fonte: Brix (1993).

2.3.2 Redução de desreguladores endócrinos em tanques de microalgas

Após a etapa de tratamento secundária de efluentes sanitários, as concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo) ainda se mantêm em níveis acima dos prescritos por legislações ambientais, portanto, antes do lançamento nos corpos receptores, eles devem receber um tratamento complementar (BARBOSA, 2019). Neste contexto, têm sido amplamente estudadas espécies de microalgas que podem crescer satisfatoriamente em condições em que o nitrogênio e fósforo estão em altas concentrações, comuns a muitos efluentes (ARBIB *et al.*, 2012). O cultivo de microalgas nestes efluentes é explorado não apenas para remoção de nutrientes, micropoluentes e o dióxido de carbono, mas também para produção de biomassa microalgal, a qual pode acumular lipídeos, essencial para a produção de biodiesel (UNNITHAN *et al.*, 2014).

Os processos de fitorremediação baseiam-se no uso de sistemas onde microalgas e/ou cianobactérias absorvem nutrientes, produzem oxigênio por fotossíntese e estimulam a degradação de micropoluentes por bactérias (ALCANTARA *et al.*, 2015). O uso de algas para tratamento de esgoto vem mostrando-se uma tecnologia bastante promissora, tanto na redução de nutrientes quando no tratamento de micropoluentes (DE WILT, 2016). Quando aplicados na etapa de polimento de efluentes sanitários, a fotossíntese realizada pelas algas auxilia no aumento da concentração do oxigênio dissolvido, que por sua vez influencia na degradação da matéria orgânica. Ao mesmo tempo em que isto ocorre, as bactérias heterotróficas produzem dióxido de carbono, amônia, nitrato e fosfatos para o uso das microalgas (RABELLO *et al.* 2019). Os gêneros mais comuns de algas encontrados em efluentes são *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Micractinium*, *Euglena*, *Ankistrodesmus*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Nitzschia*, *Navicula* e *Stigeoclonium* (AMENGUAL-MORRO *et al.*, 2012).

Existem atualmente três tipos principais de sistemas de fitorremediação: Sistemas abertos, fechados e híbridos. Os sistemas abertos ou *High-rate algal ponds* (HRAPs) são os mais usados no tratamento de efluentes devido ao baixo custo de operação, entretanto são mais susceptíveis a contaminação por outras espécies e o controle dos parâmetros importantes para o crescimento (temperatura e luz solar) é mais difícil do que no sistema fechado (CHISTI, 2013). Nos sistemas fechados existe um controle maior e normalmente maior produção de biomassa. Entretanto, os custos

de operação e manutenção são maiores do que nos HRAPs (PARK e KRAGGS, 2010). Os sistemas híbridos ou semifechados como os fotobiorreatores tubulares horizontais (*PBR*) (Figura 4) são uma boa alternativa para a remoção de fármacos na etapa de polimento de efluentes (VASSALLE *et al.*, 2020).

Em estudos recentes foram reportados resultados de eficiência de remoção de micropoluentes entre 40% a >90% em *HRAPs* no tratamento de efluentes sanitários (GARCÍA-GALÁN *et al.*, 2020; VASSALLE *et al.*, 2020). Segundo Faramarzi (2008), as microalgas podem degradar os hormônios através da hidroxilação, redução, degradação da cadeia lateral e isomeração. Os processos de biotransformação convertem contaminantes orgânicos para obter carbono, ou energia necessários ao seu crescimento (GHASEMI *et al.*, 2011). Os hormônios naturais como E1, E2, E3 e progesterona são facilmente transformados pelas microalgas em alguns dias, enquanto hormônios sintéticos como o EE2 são mais persistentes no ambiente aquático (WANG *et al.*, 2016).

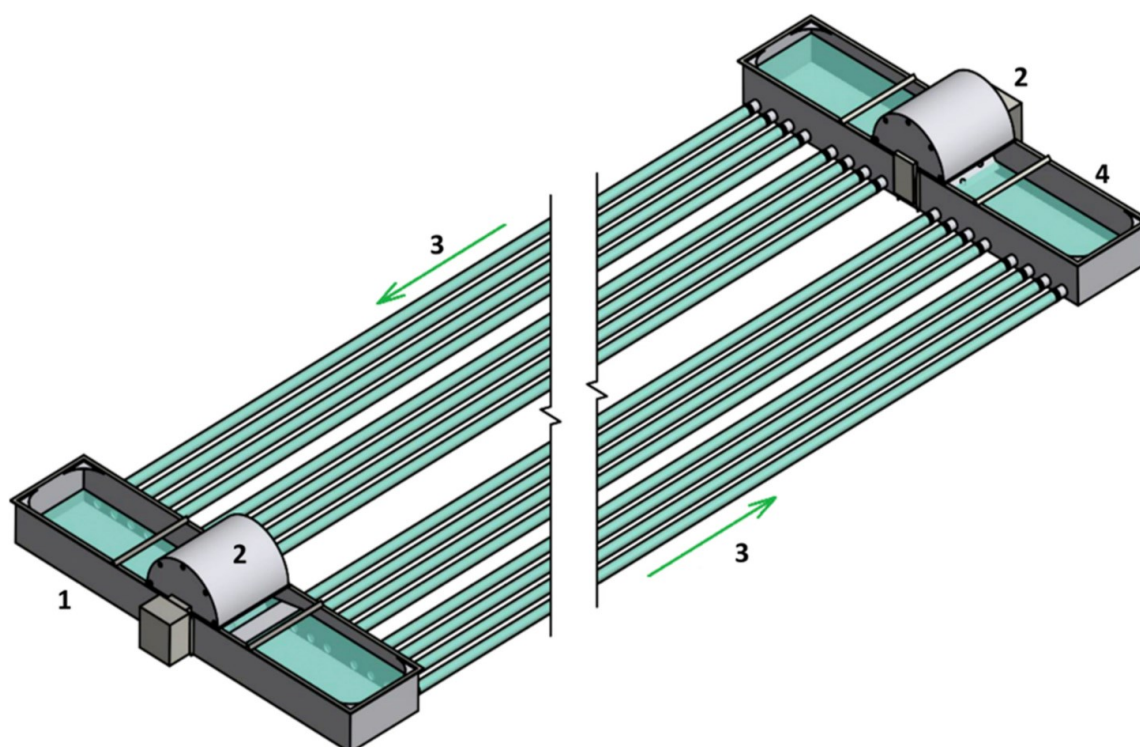


Figura 4: Fotobiorreator tubular horizontal semifechado com cultura mista de microalgas e bactérias. 1: Entrada do efluente proveniente da etapa anterior; 2: rodas d'água; 3: direção do fluxo; 4: saída do sistema. Fonte: Vassalle *et al.* (2020).

2.3.3 Etapas de redução e remoção dos estrogênios

A adoção de processos de tratamento de efluentes que oferecem condições ideais para a formação de ecossistemas de microrganismos, como no lodo ativado e nos wetlands, favorecem a redução ou transformação dos hormônios estrogênicos (CHIANG *et al.*, 2019). Os estrogênios naturais E1, E2 e E3 são facilmente degradados por reação biológica, com o auxílio de bactérias ou outros microrganismos sob condições aeróbias ou anaeróbias (SHAMSUDDIN e PRAVEENA, 2014). As etapas de redução e remoção de estrogênios são divididas principalmente em três categorias: remoção física, biodegradação e processos químicos (LIU, KANJO e MIZUTAMI, 2009).

Nesse trabalho são abordadas as características das etapas onde ocorre a remoção e redução dos estrogênios através processos físicos e pela biodegradação. A sorção e biodegradação estão entre os principais processos envolvidos na redução e remoção dos hormônios em ETEs, (BERNARDELLI, 2014). Além disso, fatores como o tempo de retenção de sólidos (TRS), tempo de detenção hidráulica (TDH) e processos de nitrificação e desnitrificação, participam diretamente na remoção e degradação de estrogênios em ETEs (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

2.3.3.1 Processo de sorção

No lodo biológico, uma grande quantidade de microrganismos compõe o lodo de área superficial considerável que potencializa o processo de sorção. Devido à característica hidrofóbica dos estrogênios, os sólidos suspensos servem de substrato de adsorção (BIRKETT; LESTER, 2003). O potencial de sorção de um composto é dado pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) que representa a relação da concentração de um composto na fase de n-octano saturado em água e sua concentração na fase aquosa saturada em n-octanol. Tal coeficiente é um indicador importante do comportamento de moléculas orgânicas no ambiente. Um valor de $\log K_{ow}$ menor do que 2.5 demonstra um baixo potencial de sorção, e um $\log K_{ow}$ maior do que 4 mostra um alto potencial de sorção em matéria orgânica (BIRKETT; LESTER, 2003). Entre os hormônios desreguladores endócrinos estudados por Xue (2010), o

EE2 apresentou os maiores valores de sorção pelo lodo que podem estar relacionados ao maior valor de K_{ow} quando comparado aos K_{ow} dos outros estrogênios. Xu, Harper e Zhao (2008) e Ren *et al.* (2007) observaram que a sorção de EE2 envolve a sorção física, como mecanismo dominante, em combinação com um relativamente baixo nível de reação química.

2.3.3.2 Processo de biodegradação

A biodegradação é uma das transformações mais significantes no tratamento de esgoto, entretanto, no caso dos estrogênios o processo é limitado do ponto de vista cinético devido às baixas concentrações desses compostos no esgoto bruto (BERNARDELLI, 2014). Dessa forma, a taxa de transformação ou degradação biológica é diretamente proporcional à concentração dos estrogênios no sistema. Joss *et al.* (2006) propuseram a seguinte classificação dos estrogênios quanto ao grau de biodegradabilidade: Substâncias com o $K_{bio} < 0,1 \text{ L.gSS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ não apresentam remoção (eficiência máxima $< 20 \%$); Substâncias com o K_{bio} entre 0.1 e $10 \text{ L.gSS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ devem ser parcialmente biodegradados (eficiência entre 20 e 90 %), o EE2 está nesta faixa; para compostos com $K_{bio} > 10 \text{ L.gSS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ espera-se uma boa remoção biológica (acima de 90 %), o E2 se enquadra nesta faixa por ter um K_{bio} de 550 a $950 \text{ L.gSS}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Algumas das vias metabólicas pelas quais as bactérias degradam os estrogênios já foram identificadas.

Segundo Joss *et al.* (2004), as principais reações envolvidas durante a degradação de estrogênios (E1, E2, E3 e EE2) são: clivagem dos conjugados como o 3-sulfato do E1 e o 16α -glucuronídeo do E3; oxidação de E2 para E1 na presença de oxigênio; em condições de anaerobiose e ausência de nitrato, na presença apenas E1, ocorre a redução de E1 para E2 e posterior degradação de ambos; degradação de E1; e a degradação de EE2 para E2, E1 e metabólitos desconhecidos. Os organismos heterotróficos podem degradar os estrogênios de duas formas: pelo uso direto como doadores de elétrons ou por cometabolismo. No primeiro caso, os microrganismos utilizam hormônios como fonte de carbono para o crescimento. No segundo caso as bactérias utilizam suas enzimas existentes para degradar hormônios (KUNG-HUI, 2013).

A degradação bacteriológica dos estrogênios naturais é feita através de várias vias metabólicas, entre elas as vias I, II, III e IV (CHEN *et al.*, 2018). Entretanto, os

metabólitos identificados através de espectrometria de massa (MS) indicam que a via mais comum em lodos ativados é a I (via 4,5-seco). Um destes metabólitos é o ácido piridinestrona-3-carboxílico, produzido a partir do produto da clivagem do anel aromático, pela enzima 4-hidroxy strona 4,5 desoxigenase, por meio de uma reação abiótica com amônio (Figura 5).

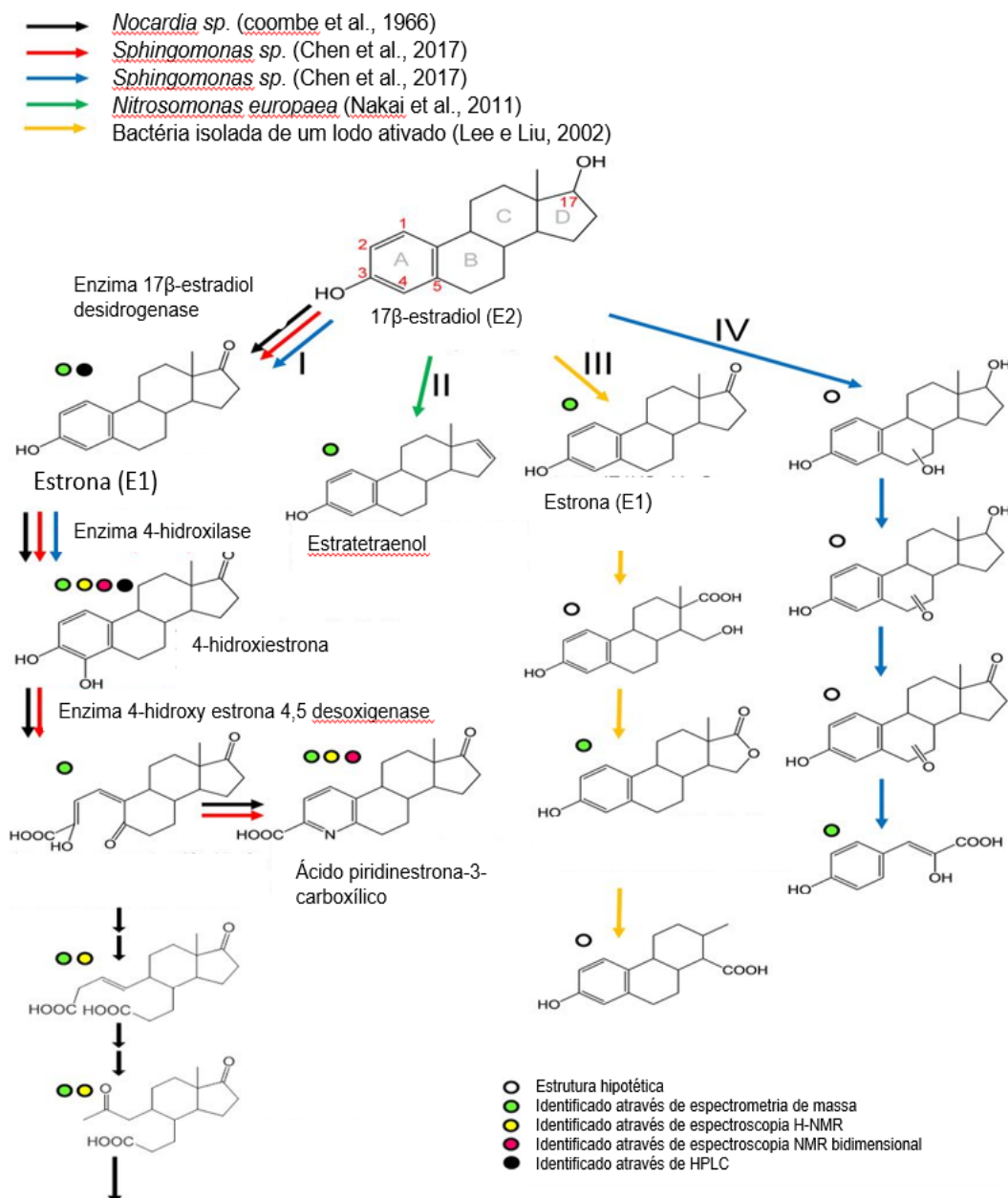


Figura 5: Vias de degradação bacteriológica do estrogênio natural E2, propostas por Chen *et al.* (2018).

A capacidade de biodegradação do estrogênio sintético EE2 foi observada em um número reduzido de microrganismos quando comparada à capacidade de biodegradação dos estrogênios naturais. Haiyan *et al.* 2006, estudaram a via de degradação do EE2 pela bactéria *Spingobacterium* sp. e observaram que esse estrogênio sintético foi inicialmente oxidado a E1, e os principais metabólitos formados foram o ácido 2-hidroxi-2,4-dienevalérico e ácido 2-hidroxi-2,4-dieno-1,6-dioico (Figura 6).

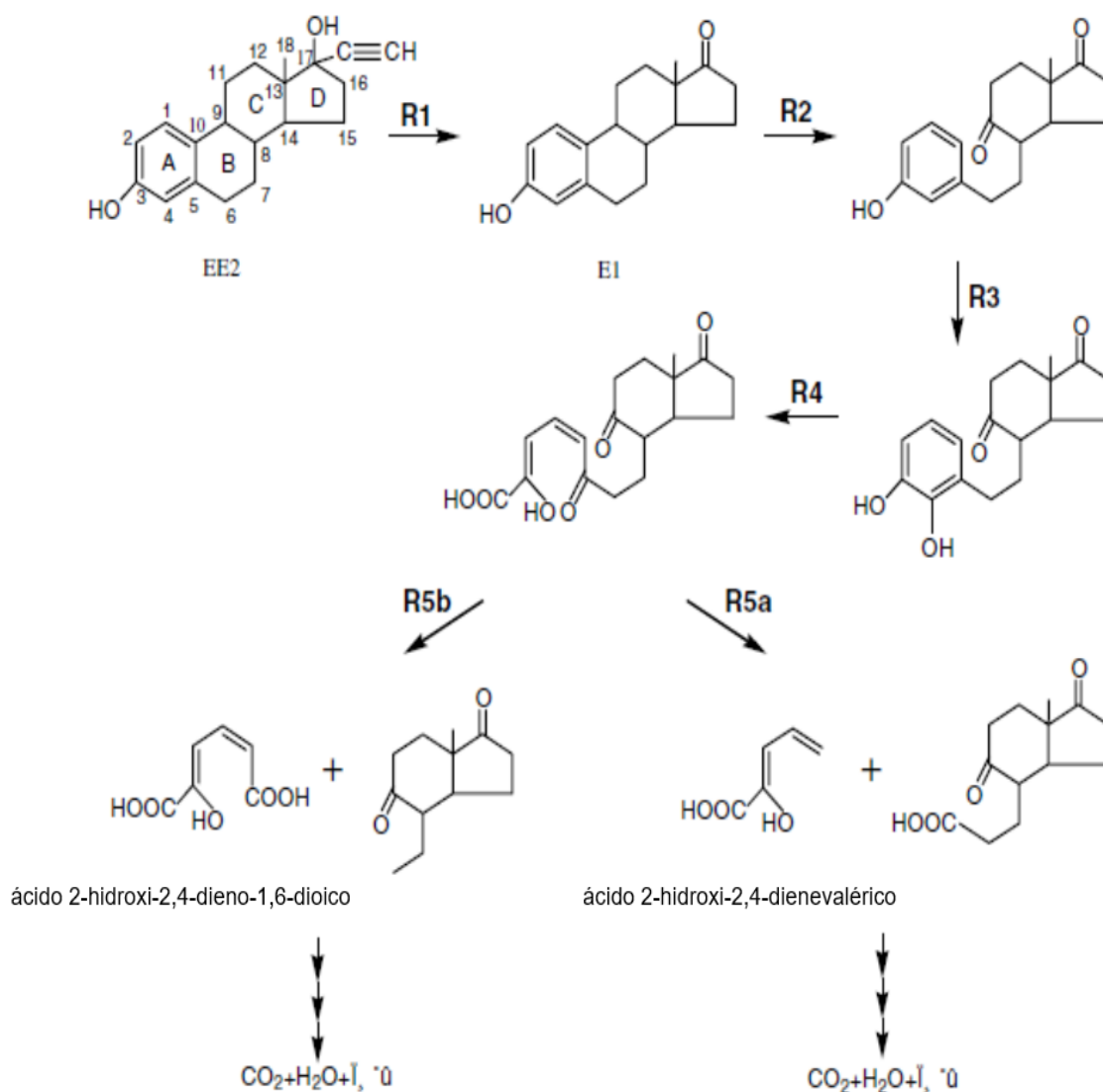


Figura 6: Via de degradação do estrogênio sintético EE2 pela *Spingobacterium* sp., proposta por Haiyan *et al.* (2006).

2.4 Bioprospecção e biotecnologia no processo de biorremediação

A diversidade biológica deve ser tratada seriamente como um recurso global, para ser registrada, usada e, acima de tudo preservada (WILSON, 1997). O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se foco principal da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria cresce de forma acelerada (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A bioprospecção é a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Segundo Martins *et al.* (2003), a bioprospecção de microrganismos selecionados naturalmente em áreas contaminadas representa uma estratégia importante, a fim de obter agentes para processos de biorremediação dessas áreas. Comunidades com histórico de contaminação tendem a ser mais adaptadas à biodegradação, e apresentam maior taxa de degradação em comparação com comunidades sem contaminação prévia (LEAHY & COLWELL, 1990). Além disso, quanto maior o tempo de contaminação, maior a chance de encontrar microrganismos biodegradadores tanto em quantidade quanto em diversidade (HASSANSHAHIAN e CAPPELLO, 2013). Atlas e Hazen (2011) observaram que em um local onde houve derramamento de milhões de litros de óleo a população bacteriana com capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo subiu de 1 – 10 % nos primeiros testes para aproximadamente 40 % ao final do ano do acidente (ATLAS e HAZEN, 2011). Além disso, devido a ocorrência de vazamentos naturais e inúmeras perfurações realizadas na busca por petróleo, o Golfo do México provavelmente é um dos locais do planeta que mais contém microrganismos adaptados à degradação de petróleo e derivados (ATLAS e HAZEN, 2011).

Desde a década de 1950, vêm sendo isoladas bactérias degradadoras de compostos químicos, pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros e vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*,

Bjerkandera e *Chrysosporium* (JACQUES *et al.*, 2006). Como exemplo, uma das melhores estratégias para eliminação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) dos solos contaminados por petróleo e seus derivados é através do uso de bactérias (HOLLINGER *et al.*, 1997). Este processo é mais provável quando a estrutura química do composto poluente é semelhante à estrutura de moléculas naturais (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Pesquisas identificaram que espécies de bactérias (DONOVA e EGOROVA, 2012), leveduras (LIU *et al.*, 2017), fungos (KRISTAN E RIZNER, 2012) e microalgas (POLLIO *et al.*, 1994) conseguem transformar os hormônios estrogênicos. Além disso, estudos como o de Holert *et al.* (2018) identificaram bactérias capazes de mineralizar completamente estes compostos a CO₂ e H₂O.

3 REVISÃO SISTEMÁTICA

Segundo Charters Kitchenham (2007), a revisão sistemática de literatura é definida como uma forma de identificar, analisar e interpretar todo o conteúdo de pesquisa disponível que seja relevante para uma questão específica de pesquisa. Esse método consiste em investigação focada em uma pergunta bem definida, que tem por objetivo avaliar e sintetizar as evidências disponíveis e relevantes sobre um determinado tema (GALVÃO; PEREIRA, 2014). Além de sintetizar os resultados de um conjunto de estudos de interesse, a revisão sistemática também permite avaliar de forma objetiva e reproduzível a qualidade da evidência científica sobre temática delimitada, identificando suas limitações e potencialidades (GALVÃO *et al.*, 2004).

Segundo Cordeiro *et al.* (2007), na revisão narrativa (tradicional), que é elaborada por uma pesquisa mais abrangente, sem especificações de bases de pesquisas, a escolha de artigos fica sujeita à percepção do autor. Diferente desta revisão tradicional (Tabela 4), a sistemática se apresenta de forma mais objetiva e com meios mais específicos de investigação (SAMPAIO, 2007).

Itens	Revisão Narrativa	Revisão Sistemática
Pergunta	Ampla	Específica
Fonte	Frequentemente não especificada	Estratégia de busca explícita
Seleção	Frequentemente não especificada	Baseada em critérios uniformes
Avaliação	Variável	Críteriosa e reproduzível
Síntese	Qualitativa	Quantitativa

Tabela 4: Diferenças entre a revisão narrativa e a revisão sistemática. Fonte: Adaptado de Rother (2007).

De acordo com Kitchenham (2007), o processo de revisão sistemática deve iniciar-se com a definição da pergunta de base da investigação e dos métodos que serão utilizados. Estas etapas devem seguir critérios preestabelecidos para definir a elegibilidade de estudos, sintetizar e interpretar os dados encontrados (CASTRO, 2001). Essas etapas têm o objetivo de minimizar a ocorrência de erros nas conclusões estabelecidas a partir da evidência disponível (ROUNDTREE *et al.*, 2008). Isso

possibilita que outros pesquisadores possam seguir os mesmos protocolos de pesquisa para chegar em conclusões semelhantes (ROUNDTREE *et al.*, 2008).

3.1 Metodologia

O procedimento metodológico adotado para a revisão sistemática deste estudo segue nos itens abaixo, que descrevem todo o processo de busca, seleção, avaliação e síntese dos estudos encontrados. A Figura 7 apresenta um resumo das fases da revisão sistemática, de modo a possibilitar a reprodutibilidade de estudos semelhantes no futuro.

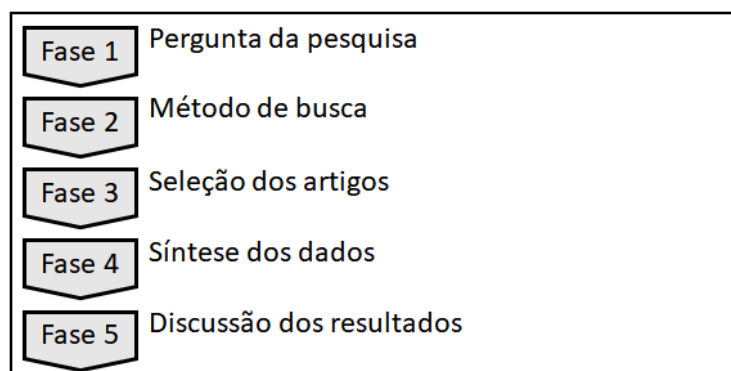


Figura 7: Fases de uma revisão sistemática. Fonte: Adaptado de Galvão e Pereira (2014).

3.1.1 Pergunta da Pesquisa

No presente estudo foi avaliada a eficiência de degradação dos estrogênios E1, E2, E3 e EE2 por microrganismos, isolados de diferentes matrizes ambientais, em sistemas aeróbios de tratamento de efluentes. Com isso, foi possível analisar criticamente o desempenho desses sistemas, tanto em escala real quanto em ensaios de bancada.

3.1.2 Método de Busca

Para a revisão sistemática, a seleção dos artigos foi feita através da plataforma *Scopus*, banco de dados de resumos e citações da literatura científica mundial. Essa plataforma permite a utilização de filtros que auxiliam na triagem dos artigos,

possibilitando se alcançar um número viável de trabalhos a serem avaliados a partir de um método que pode ser reprodutível.

3.1.3 Seleção de Artigos

Foram utilizados os seguintes termos na seleção de artigos: *Hormone biodegradation bacteria*. Apenas artigos publicados em inglês, entre os anos 2000 e 2020, foram selecionados. Um total de 42 artigos atenderam aos critérios gerais, dentre os quais 22 foram selecionados por apresentarem dados de biodegradação de estrogênios em matrizes contaminadas utilizando microrganismos isolados ou em consórcios.

3.1.4 Síntese dos dados

Os dados dos artigos selecionados foram sistematizados em uma planilha de Excel onde as seguintes informações foram extraídas: Ano de publicação; país de origem do estudo; compostos-alvo da biodegradação; concentração inicial dos compostos-alvo; classificação dos microrganismos estudados; tempo de avaliação da biodegradação; taxa de biodegradação dos compostos-alvo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Discussão da revisão sistemática

Entre os artigos selecionados, 52% foram publicados na Ásia, 22% na Europa, 22% na América do Norte e 4% na América do Sul (Figura 8). A China e os Estados Unidos foram os países com maior número de publicações, 39% e 22% respectivamente. Estes dados estão em linha com o relatório emitido pela *U.S. National Science Foundation* (NSF) que apontou um avanço significativo da China em relação ao número de publicações, que em três décadas saiu de níveis de publicação consideradas de terceiro mundo para as primeiras posições, competindo tanto com a União Europeia como com os Estados Unidos.

Segundo a NSF, a produção científica do Brasil cresceu 30% entre 2013 e 2018 — o dobro da média mundial, de 15%. O País continua sendo o 13º produtor de ciência no mundo, em número de trabalhos publicados. Segundo o *Nature Index* (2019), o Brasil ocupa o 1º lugar entre os países da América Latina e 23º no cenário global. Mesmo com esse aumento considerável na produção científica nos últimos anos, o Brasil teve pouca representatividade na pesquisa realizada.

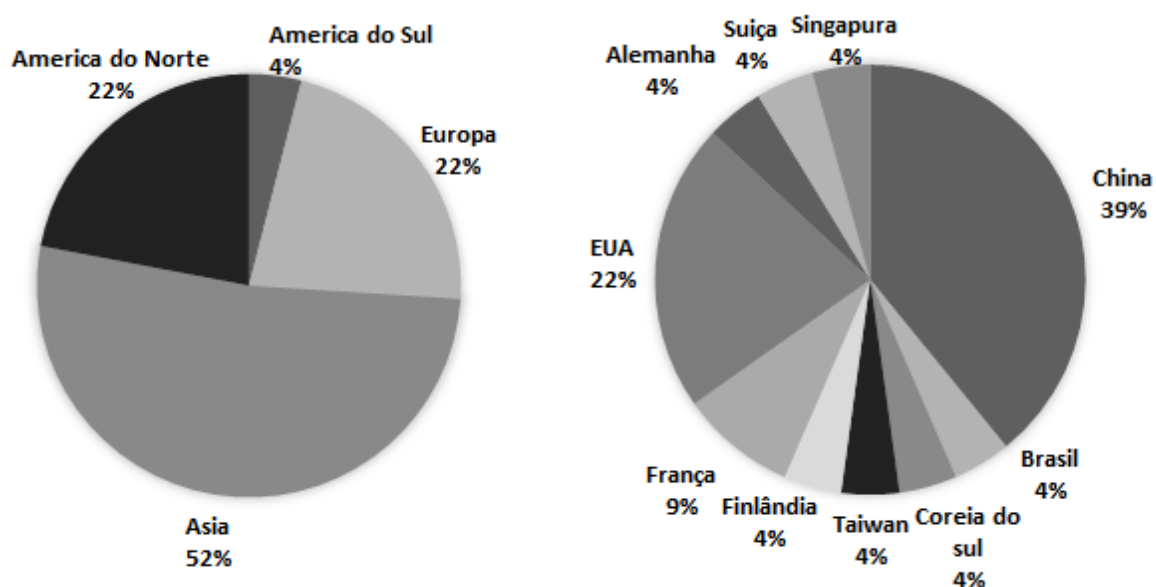


Figura 8: Percentual de publicações científicas por continente e país de origem.

O Brasil abriga a maior diversidade de animais e de plantas do mundo, possui entre 15% e 20% do número total de espécies, conta com a mais diversa flora do planeta, número este superior a 55 mil espécies descritas, cerca de 22% do total mundial, estimado em 270 mil espécies (PEREIRA, 2009). Quanto à diversidade de microrganismos, apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Tudo isso indica que a prospecção de microrganismos degradadores de compostos micropoluentes tem no Brasil um campo fértil.

Nos artigos selecionados, experimentos em escala real e em laboratório foram desenvolvidos pelos pesquisadores visando estudar a cinética de degradação de estrogênios por microrganismos em sistemas de tratamento de efluentes. Esses microrganismos foram selecionados e isolados de diferentes matrizes (Figura 9), através da técnica de enriquecimento em meio mínimo (MM) sem carbono orgânico. Nessa técnica, a substância de interesse é utilizada como única fonte de carbono orgânico para o crescimento microbiano.

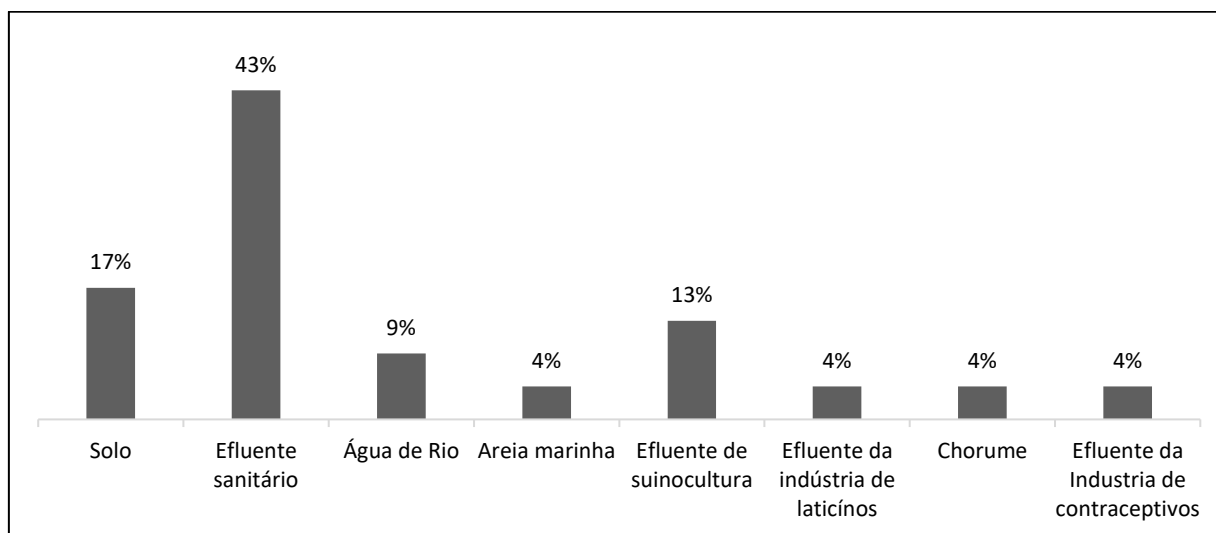


Figura 9: Percentual de publicações e matriz de origem dos microrganismos usados no processo de degradação dos estrogênios.

As publicações científicas, que atenderam aos critérios adotados neste trabalho, avaliaram a biodegradação de estrogênios por microrganismos. Estes trabalhos desenvolveram ensaios em laboratório e em escala real, considerando diferentes condições e concentrações dos estrogênios E1, E2 e EE2.

Entre as condições estabelecidas nos ensaios, o tempo de detenção hidráulica (TDH) e o tempo de retenção de sólidos (TRS) foram os parâmetros que mais influenciaram na redução dos estrogênios. Dessa forma, estrogênios com cinética de biodegradação lenta requerem um TDH maior do que os que têm cinética de biodegradação mais rápida (FERNANDES-FONTAINA *et al.*, 2012). O TRS está diretamente relacionado à diversidade microbiológica no lodo, ou seja, quanto maior for o TRS maior será a concentração de bactérias de crescimento lento (CASTRO, 2017). Entre essas bactérias estão as nitrificantes, que têm papel importante na degradação de estrogênios (SUAREZ *et al.*, 2010). Em sistemas convencionas de lodo ativado, o TRS é normalmente da ordem de 4 a 10 dias e o TDH de 6 a 8 h (VON SPERLING, 2012). Além disso, a meia-vida do composto-alvo também foi levada em consideração pelos trabalhos avaliados. Segundo Ying *et al.* (2002), em ambientes aquáticos, a meia-vida do E1, E2 e EE2 é de aproximadamente 2, 3 e 6 dias, respectivamente. Portanto, em ensaios longos, os pesquisadores mantiveram a concentração dos estrogênios, nos reatores, através de aportes constantes. Durante os ensaios, a degradação abiótica foi monitorada através de controles compostos apenas por MM e estrogênio.

Biodegradação do estrogênio E1

A cinética de biodegradação do estrogênio E1 foi avaliada pelos trabalhos de Kruglova *et al.* (2016), Bernardelli *et al.* (2019), Ke *et al.* (2007) e Muller *et al.* (2009) (Tabela 5).

Kruglova *et al.* (2016) avaliaram a redução do E1 através do lodo ativado em um biorreator de membrana (MBR) com alta atividade nitrificante. Os autores trabalharam com concentração inicial de 0.002 mg.L^{-1} de E1 e TRS de 90 dias. Nesse ensaio, o E1 foi completamente degradado após um TDH de 8.5 horas a uma temperatura constante de $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Segundo os autores, a boa eficiência do processo pode ser atribuída à grande diversidade de enzimas e processos metabólicos de bactérias que se desenvolveram no reator devido ao longo TDH.

Bernardelli *et al.* (2019) avaliaram a estrutura de comunidades bacterianas envolvidas na degradação de estrogênios. Os autores estudaram o desempenho de um reator aeróbio, com lodo biológico proveniente de um sistema de lodo ativado de uma ETE municipal, no tratamento de um efluente sintético com 0.62 mg.L^{-1} de E1

como única fonte de carbono. As bactérias foram capazes de degradar totalmente o estrogênio em 24 h. A partir dos dados obtidos, os pesquisadores concluíram que a alta taxa de remoção em termos de massa ocorreu principalmente por via da biodegradação.

Ke *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de degradação de estrogênios por bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Agromyces*, *Sphingomonas* em efluente secundário ultrafiltrado. Os autores estudaram a biodegradação aeróbia e anaeróbia de E1 na concentração de 0.5 mg.L⁻¹. Em condições aeróbias, os autores constataram que as bactérias dos gêneros avaliados, quando em consórcio, degradaram totalmente o E1 em 48h. Entretanto, quando isoladas, apenas as bactérias do gênero *Sphingomonas* conseguiram degradar o E1 em condições aeróbias e anaeróbias.

Muller *et al.* (2009) estudaram as características moleculares e cinéticas de uma cultura mista de microrganismos na degradação do estrogênio E1. Os pesquisadores investigaram a biodegradação do E1, concentração 3.5 mg/L, por colônias de bactérias das espécies *Alcaligenes faecalis*, *Pusillimonas sp.*, *Denitrobacter sp.*, e *Brevundimonas diminuta*. No experimento, o estrogênio foi usado tanto como única fonte de carbono (C-) como em conjunto com outra fonte, a acetoneitrila (C+). O E1 foi degradado nas condições C- e C+ após fase lag de 72h.

Autor	País	Escala	Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)	Microrganismo	TDH (horas)	Redução (%)
Kruglova <i>et al.</i> (2016)	Finlândia	Laboratório	E1	0.002	Consórcio microbiológico	8.5	100%
Bernardelli <i>et al.</i> (2019)	Brasil	Laboratório	E1	0.62	<i>Pseudomonas</i> e <i>Nitrospira</i>	24	100%
Ke <i>et al.</i> (2007)	Singapura	Laboratório	E1	0.5	<i>Acinetobacter</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Sphingomonas</i>	48	100%
Muller <i>et al.</i> (2009)	França	Laboratório	E1	3.5	Consórcio microbiológico	48	100%

Tabela 5: Estudos sobre degradação de diferentes concentrações de E1 pelas bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Nitrospira*, *Acinetobacter*, *Agromyces*, *Sphingomonas* e por consórcio microbiológico.

17 β -estradiol (E2)

A biodegradação do E2 (Tabela 6) foi estudada pelos trabalhos de Pieper e Rotard (2010), Hua *et al.* (2018), Bernardelli *et al.* (2019), Ke *et al.* (2007), Yang *et al.* (2009), Li *et al.* (2012), Yu *et al.* (2007) e Muller *et al.* (2009).

Pieper e Rotard (2010) investigaram o processo de redução da concentração do estrogênio E2, através de bactérias isoladas do biofilme formado em um rio do parque nacional Unteres Odertal - Alemanha. As bactérias desse biofilme foram usadas nos experimentos de degradação do E2, através de reatores de fluxo contínuo e de ensaios em bancada com frascos Erlenmeyer. No experimento com os reatores de fluxo contínuo, os pesquisadores observaram que com um TRS de 32 horas os 0.1 mg.L⁻¹ do estrogênio E2 foram completamente degradados após 8h. O potencial de degradação desse estrogênio também foi observado nos ensaios de bancada, onde 0.1 mg.L⁻¹ do E2 foi completamente degradado. Dessa forma os autores concluíram que esses microrganismos poderiam aumentar a eficiência de redução do estrogênio E2 em ETEs municipais.

Hua *et al.* (2018) estudaram a eficiência de redução da concentração de E2 através da combinação entre um processo eletroquímico e a degradação por microrganismos oriundos do processo de lodo ativado. Nesse estudo, o processo eletroquímico (densidade da corrente elétrica 20 mA/cm²) combinado com microrganismos aeróbios teve eficiência de 99.3% ao reduzir a concentração do de um efluente contaminado com 0.5 mg.L⁻¹ de E2. Essa redução foi alcançada após 90 min. com um TRS 7 dias. Portanto, com esse estudo, os autores demonstraram que o método combinado, eletroquímico e biológico, pode ser viável em ETEs.

Bernardelli *et al.* (2019) avaliaram a presença de consórcios bacterianos, presentes em sistemas de lodo ativado, capazes de degradar estrogênios. Através de reatores em bateladas sequenciais (SBR), essas bactérias foram capazes de degradar 98% do estrogênio E2, concentração 0.62 mg.L⁻¹, após 24 h. Os autores observaram que quando o estrogênio é colocado como única fonte de carbono nos reatores, o desenvolvimento de microrganismos específicos capazes de degradar esses compostos aumenta.

Ke *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de degradação de estrogênios por bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Agromyces*, *Sphingomonas* em efluente

secundário ultrafiltrado. Os autores estudaram a biodegradação aeróbia e anaeróbia de E2 na concentração de 0.5 mg.L^{-1} . Em condições aeróbias, os autores constataram que as bactérias dos gêneros avaliados, quando em consórcio, degradaram totalmente o E2 em 48h. Entretanto, quando isoladas, apenas as bactérias do gênero *Agromyces* conseguiram degradar o E2 em condições aeróbias e anaeróbias.

Yang *et al.* (2009) avaliaram a cinética de degradação do E2 por bactérias provenientes de estrume suíno. Os pesquisadores desenvolveram dois sistemas de biodegradação (Sistema 1 e Sistema 2). No Sistema 1, adicionaram 0.5 g de estrume suíno em meio mínimo com 3 mg.L^{-1} de E2 e incubaram a 22°C , com agitação constante de 250 rpm. No sistema 2, fizeram um pré-enriquecimento da cultura proveniente do estrume suíno adicionando 1 g de estrume suíno em caldo de soja trypticase (TSB). Após 14h de incubação a 22°C , 1 ml da suspensão bacteriana foi adicionada em meio mínimo fortificado com 3 mg.L^{-1} de E2. Essa solução foi incubada a 22°C em agitação constante de 250 rpm. Os resultados indicaram que no sistema 1 o E2 foi completamente degradado em um TDH de 9 h. Entretanto, apenas 20% do estrogênio foi degradado no sistema 2 durante o mesmo período.

Li *et al.* (2012) estudaram os mecanismos moleculares envolvidos na degradação do hormônio E2 pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*. Após um pré-enriquecimento para aumentar a densidade de bactérias, os pesquisadores avaliaram a redução de 3.3 mg.L^{-1} do estrogênio em um efluente sintético. Os microrganismos degradaram 99.4% do E2 após um TDH de 16 h. Nesse experimento, o E2 foi degradado a E1 e depois em tirosina (aminoácido importante para a biossíntese de proteínas).

Yu *et al.* (2007) avaliaram a degradação do E2 por bactérias oriundas de lodo ativado. Nesse estudo os pesquisadores isolaram cepas dos gêneros *Aminobacter* (cepa KC6 e KC7), *Brevundimonas* (cepa KC12), *Escherichia* (cepa KC13), *Flavobacterium* (cepa KC1), *Microbacterium* (cepa KC5), *Nocardioides* (cepa KC3), *Rhodococcus* (cepa KC4) e *Sphingomonas* (cepa KC8 – KC11 e KC14) capazes de degradar o E2. As cepas conseguiram transformar completamente todo o E2, concentração 3 mg.L^{-1} , em E1 durante TDH de 168 h. Entretanto, apenas as cepas KC6, KC7 e KC8 degradaram o E1.

Muller *et al.* (2009) estudaram as características moleculares e cinéticas de uma cultura mista de microrganismos na degradação de E2. Os pesquisadores

investigaram a biodegradação do estrogênio E2, concentração 3.5 mg.L⁻¹, por bactérias das espécies *Alcaligenes faecalis*, *Pusillimonas sp.*, *Denitrobacter sp.*, e *Brevundimonas diminuta*. No experimento, o estrogênio foi usado tanto como única fonte de carbono (C-) e em conjunto com outra fonte, a acetonitrila (C+). As bactérias foram capazes de degradar totalmente o E2 em 24h, nas duas condições C- e C+.

Autor	País	Escala	Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)	Microorganismo	TDH (horas)	Redução (%)
Pieper e Rotard (2010)	Alemanha	Laboratório	E2	0.1	Consórcio microbiológico + meio nutritivo	8	100%
Hua <i>et al.</i> (2018)	China	Laboratório	E2	0.5	Bacillus, Lysinibacillus e Aeromonas	2	99.3%
Bernardelli <i>et al.</i> (2019)	Brasil	Laboratório	E2	0.62	Pseudomonas e Nitrospira	24	98%
Ke <i>et al.</i> (2007)	Singapura	Laboratório	E2	0.5	Acinetobacter, Agromyces, Sphingomonas	48	100%
Yang <i>et al.</i> (2009)	EUA	Laboratório	E2	3	Consórcio microbiológico	9	100%
Li <i>et al.</i> (2012)	EUA	Laboratório	E2	3.3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16	99.4%
Yu <i>et al.</i> (2007)	EUA	Laboratório	E2	3	<i>Sphingomonas strains</i> KC8	168	100%
Muller <i>et al.</i> (2009)	França	Laboratório	E2	3.5	Consórcio microbiológico	24	100%

Tabela 6: Pesquisas sobre a degradação de diferentes concentrações de E2 por bactérias isoladas e em consórcio.

17 α -etinilestradiol (EE2)

Os trabalhos de Bernardelli *et al.* (2019), Kruglova *et al.* (2016), Pieper e Rotard (2010), Clouzot *et al.* (2010) e Ke *et al.* (2007) avaliaram a eficiência de degradação do EE2 em concentrações iguais ou inferiores a 1 mg.L⁻¹, por outro lado, as pesquisas de He *et al.* (2019), Muller *et al.* (2009) e Haiyan *et al.* (2006) avaliaram a eficiência de degradação do EE2 em concentrações acima de 3 mg.L⁻¹ (Tabela 7).

Bernardelli *et al.* (2019) avaliaram a estrutura de comunidades bacterianas envolvidas na degradação de hormônios. Os autores inocularam bactérias provenientes de sistemas de lodos ativados e efluente com hormônios EE2,

concentração 0.112 mg.L⁻¹, em um reator aeróbio. As bactérias foram capazes de degradar 84% do hormônio sintético em um TDH de 34 dias. A partir dos dados obtidos, os pesquisadores concluíram que a alta taxa de remoção em termos de massa ocorreu principalmente por via da biodegradação.

Kruglova *et al.* (2016) avaliaram a redução de EE2, concentração 0.05 mg.L⁻¹, através do processo de lodos ativados em um biorreator de membrana (MBR) e em reatores expostos a baixas temperaturas. Após TDH de 24h o lodo ativado do MBR, com TRS de 90 dias, removeu 66% do EE2.

Pieper e Rotard (2010) investigaram o processo de redução do estrogênio sintético EE2, concentração 0.1 mg.L⁻¹, através do uso de biofilme em reatores de fluxo contínuo. Esses reatores foram operados com dois meios nutritivos diferentes com EE2. Após um TDH de 32h os pesquisadores reportaram degradação total do EE2.

Clouzot *et al.* (2010) avaliaram a cinética de degradação do hormônio EE2, concentração 1 mg.L⁻¹, por bactérias nitrificantes do lodo ativado de um biorreator de membrana (MBR). Os pesquisadores observaram que o lodo ativado aclimatado em condições favoráveis para a atividade nitrificante removeu 99% (sorção + biodegradação) do EE2. Por outro lado, o lodo ativado sem aclimação, proveniente do sistema convencional de tratamento, removeu 88% do EE2 apenas por sorção. Os autores concluíram que a atividade nitrificante no lodo aclimatado foi o principal fator para a redução do EE2.

Ke *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de degradação de estrogênios por bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Agromyces*, *Sphingomonas* em efluente secundário ultrafiltrado. Os autores estudaram a biodegradação aeróbia e anaeróbia do estrogênio EE2. Nas condições do ensaio, concentração de 1 mg.L⁻¹, as bactérias não foram capazes de degradar o estrogênio sintético.

Muller *et al.* (2009) estudaram as características moleculares e cinéticas de uma cultura mista de microrganismos na degradação do estrogênio sintético. Os pesquisadores investigaram a biodegradação dos EE2 por colônias de bactérias das espécies *Alcaligenes faecalis*, *Pusillimonas sp.*, *Denitrobacter sp.* e *Brevundimonas diminuta*. Nos experimentos, os hormônios foram usados tanto como única fonte de carbono (C-) e em conjunto com outra fonte, a acetoneitrila (C+). As bactérias

degradaram completamente o EE2, concentração 3.5 mg.L⁻¹, entre 8 e 11 dias, independentemente da fonte de carbono (C- ou C+).

Haiyan *et al.* (2006) estudaram a via metabólica e as características de degradação do EE2 pela bactéria *Sphingobacterium sp.* Os autores reportaram que a cepa foi capaz de crescer em meio mínimo com EE2 como única fonte de carbono e energia e metabolizou 81% do estrogênio, concentração 30 mg.L⁻¹, em 10 dias a uma temperatura de 30°C. A via metabólica observada no estudo, através da espectrometria de massa, indicou que o EE2 foi oxidado a E1.

Autor	País	Escala	Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)	Microorganismo	TDH (horas)	Redução (%)
Bernardelli <i>et al.</i> (2019)	Brasil	Laboratório	EE2	0.112	Consórcio microbiológico	816	84%
Kruglova <i>et al.</i> (2016)	Finlândia	Laboratório	EE2	0.05	Consórcio microbiológico	24	66%
Pieper e Rotard (2010)	Alemanha	Laboratório	EE2	0.1	Consórcio microbiológico	32	100%
Clouzot <i>et al.</i> (2010)	França	Laboratório	EE2	1	Consórcio microbiológico	0.16	99%
Ke et al (2007)	Singapura	Laboratório	EE2	1	Acinetobacter, Agromyces, Sphingomonas	360	0%
Muller <i>et al.</i> (2009)	França	Laboratório	EE2	3.5	Consórcio microbiológico	264	100%
Haiyan <i>et al.</i> (2006)	China	Laboratório	EE2	30	Sphingobacterium sp. JCR5	240	81%

Tabela 7: Pesquisas sobre a degradação de diferentes concentrações de EE2 pelas bactérias do gênero *Acinetobacter*, *Agromyces*, *Sphingomonas*, *Hyphomicrobium sp* *Sphingobacterium sp.* e por consórcio microbiológico.

Avaliação da estrogenicidade

A cromatografia foi a técnica utilizada pelos trabalhos selecionados que avaliaram os subprodutos da biodegradação dos compostos-alvo. Entretanto, após o processo de biodegradação dos compostos estrogênicos é importante avaliar não só a concentração, mas também a estrogenicidade dos subprodutos. Em muitos casos, uma substância sozinha não é capaz de provocar efeitos tóxicos sobre a biota, mas quando interage com outras substâncias presentes no ambiente, pode produzir

compostos derivados capazes de provocar danos ao ambiente (BRESSOLA, 2007; SALOMÃO *et al.*, 2014) (apud SABINO, 2018).

Dentre as técnicas capazes de avaliar a estrogenicidade a partir da interação entre receptores hormonais e a proliferação celular, podem ser citados o ensaio *Yeast Estrogen Screen (YES)* e a célula *Michigan Cancer Foudation-7 (MCF-7)*.

O ensaio YES é um ensaio realizado com cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* acrescentadas de vetores contendo sequências de DNA para receptores humanos e animais, junto a um gene repórter contendo elementos respostas, onde a ativação do receptor pela substância ou composto testado resulta na estimulação da expressão do gene repórter seguida pela ativação de um elemento resposta (Santos, 2016).

O ensaio MCF-7 baseia-se na proliferação de culturas de células cancerígenas mamárias humanas MCF-7 induzida pela exposição à substância estrogênica. O ensaio é baseado em três premissas: (1) fatores presentes no soro adicionado no meio inibem a proliferação das MCF-7, (2) os estrogênios induzem a proliferação das células pela anulação deste efeito inibitório e (3) substâncias não estrogênicas não neutralizam o sinal inibitório presente no soro (ZACHAREWSKI, 1997) (apud FERREIRA, 2008).

Bactérias degradadoras de estrogênios

O filo Proteobacteria é o maior e mais metabolicamente diverso dentro do domínio Bacteria. Aproximadamente um terço das espécies bacterianas já caracterizadas estão neste grupo, havendo espécies de interesse para diversas áreas como a medicina, agricultura e indústria. A diversidade metabólica contempla espécies quimiolitotróficas, quimiorganotróficas e fototróficas. O filo Proteobacteria apresenta seis classes distintas, sendo as maior destaque Alpha-, Beta-, Gama- e Deltaproteobactéria, todas elas representadas neste trabalho.

Dentre as Gamaproteobactérias destaca-se o gênero *Pseudomonas*, conhecido pela habilidade de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Assim, esse gênero é bastante comum pela habilidade de degradar hidrocarbonetos, disruptores endócrinos, dentre outros compostos contaminantes.

O gênero *Sphingomonas*, pertencente a classe das Alphaproteobactérias, também apresenta alta versatilidade metabólica, sendo capaz de metabolizar diferentes compostos orgânicos, incluindo compostos aromáticos presentes em ambientes contaminados (tolueno, naftaleno). Este gênero é bastante explorado em estudos de biorremediação.

Outro filo que se destaca nos estudos de bioprospecção é Actinobacteria, formado por espécies encontradas principalmente no solo, tendo alguns representantes produtores de antibióticos. O gênero *Streptomyces* é bastante conhecido pela produção do antibiótico estreptomicina.

O filo Bacteroidetes apresenta diversas espécies anaeróbias encontradas no trato gastrointestinal de humanos e outros animais. Uma vez que muitos estudos aqui avaliados utilizam o esgoto como matriz para o isolamento dos microrganismos, é natural que este grupo tenha uma boa representatividade.

O filo Firmicutes também abriga espécies anaeróbias, sendo um grupo muito encontrado em diversos tipos de solo. Muitas espécies possuem a habilidade de produzir esporos e podem ficar em estado de dormência em condições adversas. O gênero *Bacillus* é esporulante e produtor de diversos antibióticos.

Os microrganismos degradadores de hormônios estão distribuídos em diversos grupos bacterianos, podem ser encontrados em diferentes matrizes ambientais. O Brasil, com sua variedade de biomas, tem um grande potencial para ser explorado no âmbito da bioprospecção.

A classificação das principais bactérias encontradas na revisão está representada na Figura 10.

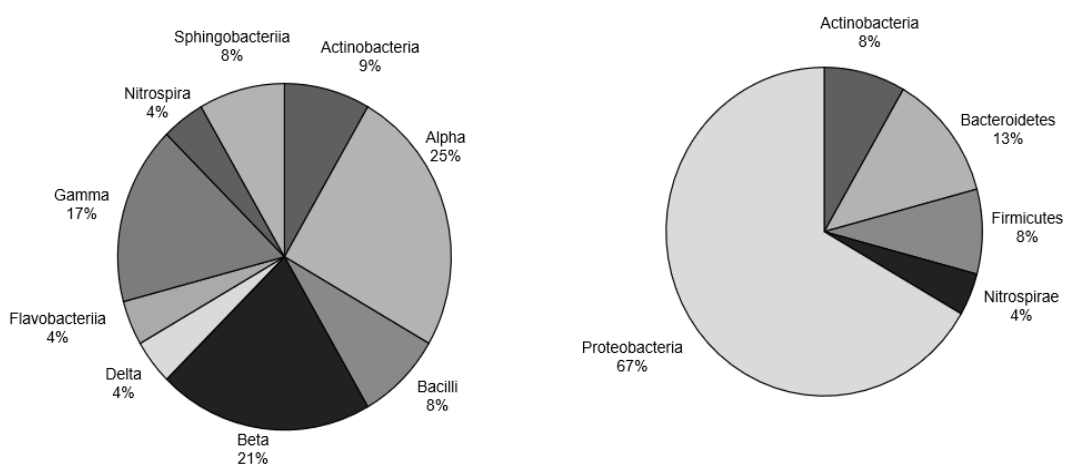


Figura 10: A – Principais filos bacterianos encontrados nos artigos avaliados. B – Principais classes de bactérias encontradas nos artigos avaliados.

5 EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO

5.1 Obtenção das amostras e meio de cultura

Em estudo prévio realizado no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Águas e Efluentes (LABIFI) da UERJ, foram detectadas altas concentrações do hormônio EE2, e de Bisfenol-A em amostras coletadas no rio João Mendes, o que suscitou o interesse em buscar por microrganismos degradadores neste local. As coletas foram realizadas nos meses de março, maio, julho e setembro de 2017 ao longo da sub-bacia do rio João Mendes, no município de Niterói-RJ, respeitando as seguintes etapas: coleta das amostras de água superficial; análise físico-química das amostras em campo e no laboratório; ensaios ecotoxicológicos (SABINO, 2018). As amostras foram coletadas e preservadas de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (ANA, 2011) e a ABNT NBR 15469:2007 (ABNT, 2007).

O meio de cultura utilizado nesse trabalho foi o meio mineral mínimo (MM), composição: 1 g K_2HPO_4 ; 0,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,2 g $MgSO_4 \cdot H_2O$; 0,2 g KCl; 1 g $NaNO_3$; água destilada q.s.p. 1000 ml, suplementado com 1% de solução de elementos-traço (12,5 mg H_3BO_3 ; 50 mg $CaSO_4 \cdot H_2O$; 25 mg $CoCl_2 \cdot H_2O$; 50 mg $CuSO_4 \cdot 7 H_2O$; 5 mg $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$; 25 mg $NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$; 5 mg $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$; 7,5 mg $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$; 750 mg $Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$); água destilada q.s.p 250 ml. (PARK *et al.*; 1999; LI *et al.* 2018).

5.2 Enriquecimento e isolamento das cepas bacterianas

Para os ensaios de enriquecimento e isolamento de estirpes bacterianas foram utilizadas amostras de água superficial de pontos onde foram detectadas altas concentrações do estrogênio EE2. Diferentes proporções (9:1, 7:3, 1:1) das amostras de água foram adicionadas ao MM e como fonte de carbono foram utilizadas concentrações crescentes de EE2, partindo da concentração de $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A cada semana o enriquecimento foi utilizado como inóculo seguindo as mesmas proporções

anteriores (9:1, 7:3, 1:1), porém a concentração do composto poluente foi aumentada para 10, 15, 20 mg.L⁻¹, sucessivamente, totalizando quatro semanas de cultivo. Para o isolamento das estirpes bacterianas foram preparadas placas contendo o meio mínimo acrescido de ágar (2%) e duas concentrações diferentes de EE2 como fonte de carbono – 15 e 20 mg.L⁻¹. Estas placas foram semeadas com 100 µL dos enriquecimentos contendo 15 e 20 mg.L⁻¹ do composto e incubadas em estufa a 28°C. O crescimento das colônias foi acompanhado por duas semanas e após o crescimento foram transferidas para novas placas com o mesmo meio de cultivo, mantendo como fonte de carbono apenas o EE2 utilizado no enriquecimento (Figura 11).

Dois tipos de colônias foram isolados no final do processo, cepa Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias 1 (LBF1) – esbranquiçada – e a cepa Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias 2 (LBF2) – amarelada (Figura 13). Para manutenção até a realização dos ensaios, as bactérias foram mantidas sob refrigeração em placa com MM e 1 mg.L⁻¹ de EE2. O tempo para obtenção dos isolados foi bastante curto, uma vez que outros trabalhos reportam ciclos de enriquecimento de 30 a 50 dias (LI *et al.* 2018; LIU *et al.* 2016).

Este resultado demonstra o potencial de se aliar estudos de avaliação de risco ecológico, onde micropoluentes são quantificados no ambiente, e estudos de bioprospecção. Ao se identificar uma matriz ambiental contaminada a técnica de enriquecimento pode ser utilizada para o isolamento de novos microrganismos degradadores, sendo possível o estudo de consórcios microbianos capazes de degradar diferentes micropoluentes ambientais simultaneamente.

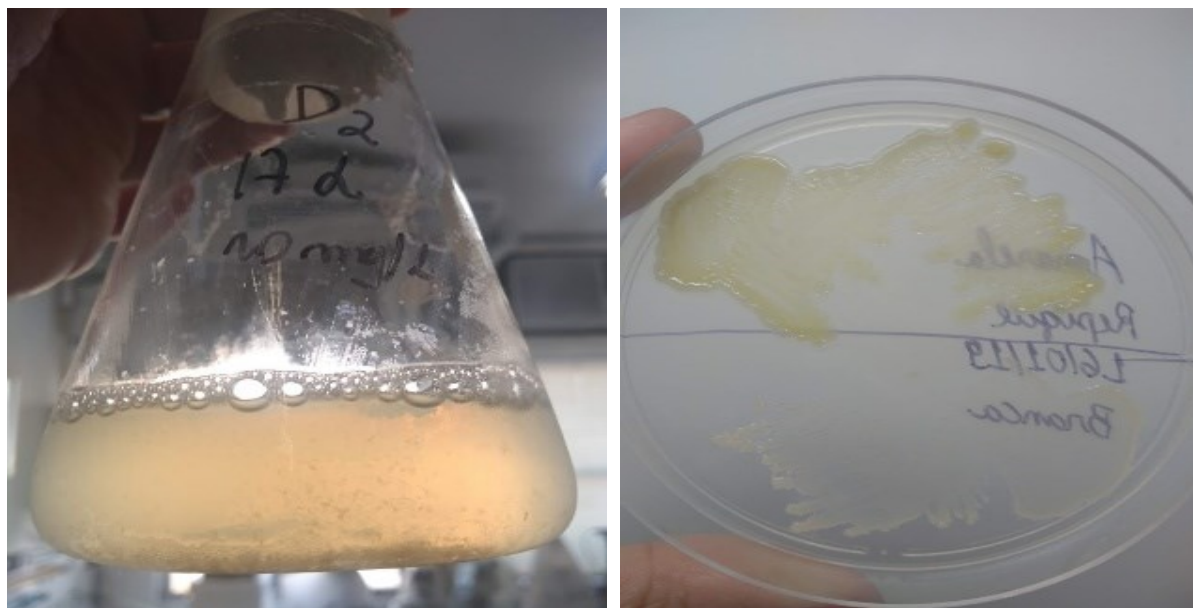


Figura 11: Crescimento bacteriano em MM com o EE2 como única fonte de carbono. Fonte: o autor.

5.3 EE2 como fonte de carbono

Para a obtenção da curva de crescimento em meio mínimo utilizando apenas o EE2 como fonte de carbono, foi realizado um repique das bactérias, cepa LBF1 e cepa LBF2, para novas placas mantendo-as em temperatura ambiente por 72 horas. Para o ensaio, 3-5 colônias de cada cepa foram inoculadas em três tubos de ensaio de 5 ml com MM e 5 mg.L^{-1} de EE2. Como controle negativo, três tubos foram mantidos apenas com MM e EE2. A suspensão foi incubada sob constante agitação (150 rpm) a 25°C no escuro. O crescimento foi avaliado a cada hora através da densidade ótica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro durante 4 dias. Cada tubo foi lido três vezes e um valor médio foi calculado para cada leitura. A curva foi construída pela média dos valores das triplicatas (Figura 12).

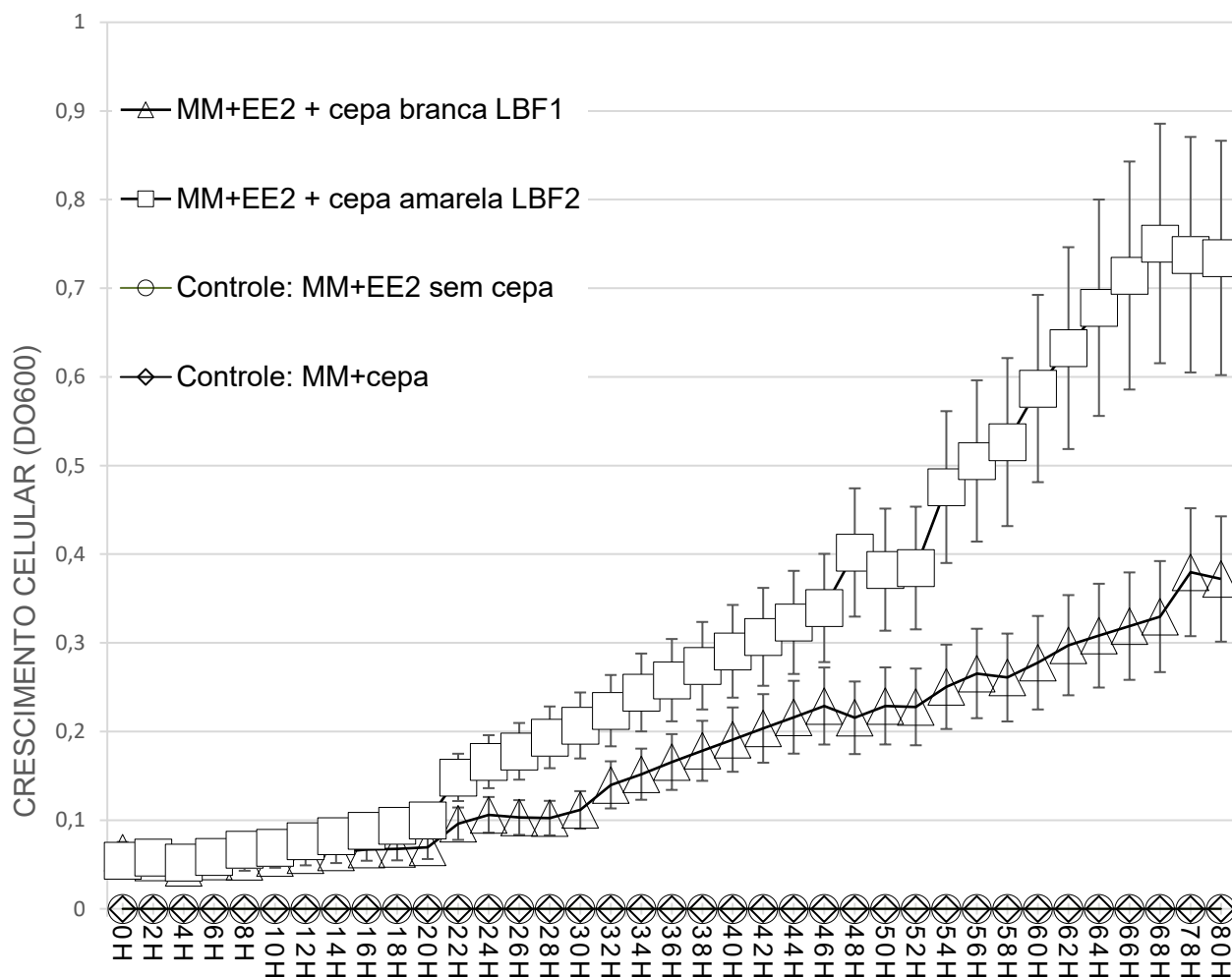


Figura 12: Crescimento das cepas LBF1 e LBF2 em MM com EE2 como única fonte de carbono.

As análises indicaram que o crescimento de células na suspensão de cepas LBF2 foi maior do que o observado na suspensão de cepas LBF1 (Figura 13). Este resultado sugere que a cepa LBF2 tem um maior potencial de degradação do EE2.

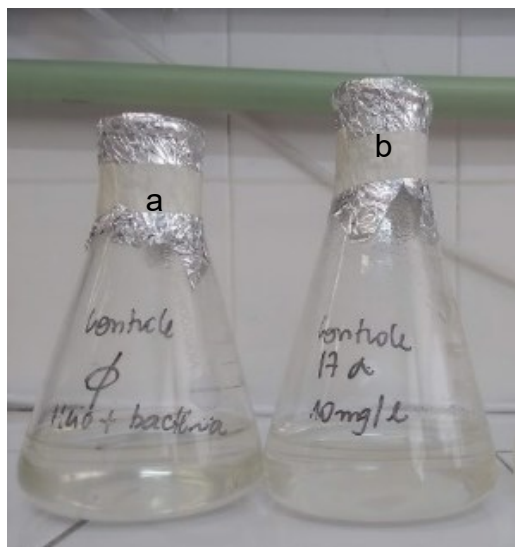


Figura 13: O controle MM: **a)** com bactéria sem hormônio (MM+cepa). **b)** com hormônio sem bactérias (MM+EE2 sem cepa). Fonte: o autor.

O estudo de Li e colaboradores (2018) mostrou a curva de degradação de duas bactérias isoladas de esterco quando crescidas em meio mineral contendo E2 como única fonte de carbono e obteve como pico de DO600 0.228 e 0.197 após 7 dias de incubação. Já o estudo de Larcher & Yargeau (2013) obteve resultados melhores para bactérias do gênero *Rhodococcus* utilizando o EE2 como fonte de carbono, com DO600 entre 1 e 2.2 após 12 dias de incubação. Os isolados aqui apresentados apresentaram uma curva de crescimento satisfatória sendo promissor prosseguir com a caracterização e perfil de degradação.

Para uma melhor avaliação do potencial de biodegradação destes isolados é preciso realizar um ensaio de biodegradação utilizando cromatografia líquida para acompanhar a taxa de degradação do EE2, bem como a possível formação de subprodutos. A redução da toxicidade pode ser avaliada utilizando-se ensaios ecotoxicológicos.

6 CONCLUSÕES

Através da revisão sistemática realizada neste estudo, para o período entre os anos 2000 e 2020, foram encontrados 22 estudos com maior abrangência sobre a eficiência de biodegradação de hormônios em matrizes contaminadas utilizando microrganismos isolados ou consórcios microbianos. A maior parte dos microrganismos com potencial de degradação dos hormônios foram isolados de efluentes sanitários (43%) e de efluentes industriais (25%). A China e os Estados Unidos são os países com maior número de trabalhos, cerca de 39% e 22% respectivamente. O número de artigos produzidos no Brasil corresponde a 4% do total dos trabalhos selecionados. Vale ressaltar que, este número é muito baixo tendo em vista a grande biodiversidade e ao clima tropical do território brasileiro.

Quanto à eficiência de redução de estrogênios, 63 % dos trabalhos que fizeram ensaios de biodegradação do E1 e E2 reportaram degradação completa, ou seja, transformação do hormônio-alvo em CO₂ e H₂O. Por outro lado, 18% dos ensaios de biodegradação do estrogênio sintético EE2 resultaram em subprodutos não estrogênicos.

No presente trabalho, as cepas LBF1 e LBF2 foram isoladas de amostras de um rio urbano poluído por esgoto sanitário, onde foram quantificadas concentrações acima de 0.025 mg.L⁻¹ de EE2 por Sabino (2018). Após um período de 24h de fase estacionária as bactérias foram capazes de crescer em MM com concentração inicial de 5 mg.L⁻¹ de EE2 em condições aeróbias.

A partir deste estudo é possível concluir que a bioprospecção aliada a avaliação de risco pode ser uma ferramenta robusta para a descoberta de novas bactérias degradadoras de micropoluentes ambientais.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. Impactos do lançamento de efluentes na qualidade da água do riacho Mussuré. 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.
- AFONSO, I. Tratamento terciário de efluentes de estações de tratamento por lodo ativado para fins de reuso como água de reposição em torres de resfriamento. Dissertação - PósGraduação em Saúde Pública, Sub-Área Saneamento Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz, 2005.
- ALCANTARA, C., POSADAS E., GUIEYSSE, B., MUNOZ, R. Microalgae-based Wastewater Treatment. In.: KIM, S. Handbook of marine microalgae. Academic Press - Elsevier. 2015.
- ALDA, M.J.L. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*. v. 1000, p. 503-526, 2003.
- ALVES, C. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbio puberais em crianças. *Cadernos de Saúde Pública*, v.23, n.5, p. 1005-1014, 2007.
- ALVES, F. A. T.; TAKAHASHI, J. A. Avaliação da eficácia do processo de biorremediação do fármaco paracetamol pelo fungo *Penicillium brasilianum* utilizando a técnica de espectroscopia na região do UV-Visível. Graduação em Química e Química Tecnológica, 2016.
- AMENGUAL-MORRO, C.; NIELL, G. M.; MARTÍNEZ-TABERNER, A. Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. *Journal of Environmental Management*, v. 95, p. S71-S76, 2012.
- ARBIB, Z.; JESUS, R.; PABLO DAVID, A.; CARMEN, G. JESUS, B. Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high-rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecological Engineering*, [s.l.], v. 52, p.143-153, 2012.
- ARAÚJO, R. K. Redução de Micropoluentes por Sistema de Tanque Séptico e Wetland Construído Vertical Com Recirculação. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2018.
- ATLAS & HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U. S. History. *Environmental Science & Technology*, v. 45, p. 6709 – 6715, 2011.
- ÁVILA, C.; MATAMOROS, V.; REYES, C.; CONTRERAS, B. P.; CASADO, M.; MITA, L.; RIVETTI, C.; BARATA, C.; GARCÍA, J.; BATONA, J.M. Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater *Sci. Total Environ.*, 470–471, 2014.

BARBOSA, S. M. S. Utilização de Microalgas e Cianobactérias para Tratamento de Efluentes e Produção Lipídica – Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

BENTO, A.P.; SEZERINO, P. H.; PHILIPPI, L. S.; REGINATTO, V.; LAPOLLI, F. R. Caracterização da microfauna em estação de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n. 4, p. 329-338, 2005.

BENOTTI, M. J.; TRENHOLM, R.A.; VANDERFORD, B.J. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science & Technology*. 2009 Feb;43(3):597-603. DOI: 10.1021/es801845a, 2009.

BERNARDELLI, J. K. B. Biodegradação de estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em sistemas aeróbios de tratamento. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química nova*, v. 26, p. 523-530. ISSN 0100-4042, 2003.

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

BOLONG, N. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, v. 239, n. 1- 3, p. 229-246, 2009.

BRANDT, E. M. F. Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (reatores uasb seguidos de pós-tratamento). Diss. Mestrado em Saneamento. do Programa Pós-Graduação em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG, 2012.

BRAGA, F. F.; AFONSO, A. E. Diagnóstico das alterações na Bacia do Rio João Mendes, Niterói, RJ: gerados pelo crescimento urbano desordenado. In: Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, 10., Geo Uerj, P. 1064 – 1076, 2003.

BRESSOLA, R. C. Avaliação de Toxicidade de Mananciais em Áreas Degradadas pela Mineração com a Utilização do Bioindicador *Scenedesmus subspicatus* e Implementação de Metodologia de Toxicidade com Peixe *Danio rerio* popular Zebrafish. 2007. 84 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

BRITISH COLUMBIA. Water Wuality Guidelines for Pharmaceutically-active-Compounds (PhACs): 17alpha-ethinylestradiol (EE2). Ministry of Environment Province of British Columbia, 2009.

BRITO, G. C. B., De Souza, D. B., Vasconcelos, F. C. W. & Da Conceição Braga, L. A importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. *Rev. em Agronegócio e Meio Ambiente* 3, 291–310, 2010.

BRIX, H. Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. In: Moshiri, G.A. (eds.), *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*, Ed: CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 9-22, 1993.

- CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*, v. 305, n. 6854, p. 609-613, 1992.
- CARSON, R. *Silent Spring*. Boston: Houghton Mifflin, 1962
- CASTRO, A. A. Revisão sistemática e meta-análise. *Compacta: temas de cardiologia*, v. 3, n. 1, p. 5-9, 2001.
- CASTRO, L. V. Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em filtros de polimento para tratamento de esgoto doméstico. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.
- CHAVES, K. S. Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.
- CHERNICHARO, C.A.L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007.
- CHEN, YL., WANG C.-H., YANG F.-H., ISMAIL W., WANG P.-H., Shih C.-J., WU Y.-C., CHIANG Y.-R. Identification of *Comamonas testosteroni* as an androgen degrader in sewage. *Sci. Rep* 6:35386. doi: 10.1038/srep35386, 2016.
- CHEN YL, YU CP, LEE TH, GOH KS, CHU KH, WANG PH, ISMAIL W, SHIH CJ, CHIANG YR. Biochemical mechanisms and catabolic enzymes involved in bacterial estrogen degradation pathways. *Cell Chem Biol* 24:712–724.2017.
- CHEN, YL., FU, H.-Y., LEE, T.-H., SHIH, C.-J., HUANG, L., WANG, Y.-S., ISMAIL, W., CHIANG, Y. -R. Estrogen Degradation and Estrogen Degradation Pathway Identified in an Activated Sludge. <https://doi.org/10.1128/AEM.00001-18>, 2018.
- CHISTI, Y. Raceways-based production of algal crude oil. *Greenpeace*, 3, pp. 195-216, 2013.
- CHIANG, Y. R., WEI, S. T. S., WANG, P. H., WU, P. H. & YU, C. P. Microbial degradation of steroid sex hormones: implications for environmental and ecological studies. *Microb. Biotechnol.* 0, 1–24, 2019.
- COOMBE, R. TSONG, Y. HAMILTON, P. SIH, CJ. Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. *J Biol Chem* 241:1587–1595. 1966.
- CORDEIRO, A. M.; OLIVEIRA, G. M.; RENTERIA, J. M.; GUIMARÃES, C. A. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 34(6), 428-431, 2007.
- CORIOLO, A. C. F. & Filho, M. C. de M. Biorremediação, Uma Alternativa Na Utilização Em Áreas Degradadas Pela Indústria Petrolífera. *Holos* 7, 133, 2016.
- DAUGHTON, C.G. Pharmaceuticals in the environment: sources and their management. *Comprehensive Analytical Chemistry*, pp. 37–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62657-8.00002-1>, 2013.

DIAS, D. X. Impacto Ambiental e Métodos de Tratamento de Micropoluentes para a Minimização de Efeitos Nocivos ao Ecossistema. Curso de Engenharia Bioquímica pela Escola de Engenharia de Lorena-USP. 1–47, 2012.

DUONG, C. N.; LEE, J.H.; LIM, B.J.; KIM, S.D. Biodegradation of estrogen Conjugates by bacteria isolated from river sediments, *Water Sci. Technol.* 64, 1750–1758. 2011.

EUROPEAN COMMISSION. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council Amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards Priority Substances in the Field of Water Policy. Brussels, Belgium, 2012.

FAIRBAIRN, D. J.; ARNOLD, W.A.; BARBER, B.L.; KAUFENBERG, E.F.; KOSKINEN W. C.; NOVAK, P.J.; RICE P.J.; SWACKHAMER D.L. Contaminants of Emerging Concern: Mass Balance and Comparison of Wastewater Effluent and Upstream Sources in a Mixed-Use Watershed. *Environ Sci Technol* 50(1):36–45, 2016.

FAIRBAIRN, D. J.; KARPUZCU M.E.; ARNOLD, W.A.; BARBER, B.L.; KAUFENBERG, E.F.; KOSKINEN W. C.; NOVAK, P.J.; RICE P.J.; SWACKHAMER D.L. Sources and transport of contaminants of emerging concern: A two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed. *Sci Total Environ* 551-552:605–613, 2016.

FERREIRA, T. C. Análise espaço-temporal do uso e cobertura do solo da Bacia Hidrográfica da Região Oceânica de Niterói-RJ: Subsídio ao Planejamento e Gestão Ambiental. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Gestão Ambiental. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

FERREIRA, M. G. M. Remoção da Atividade Estrogênica de 17β -Estradiol e de 17α -Etinilestradiol pelos Processos de Ozonização e O_3/H_2O_2 . 173 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química) Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FERNÁNDEZ, L. *et al.* Biodegradation of 17β -estradiol by bacteria isolated from deep sea sediments in aerobic and anaerobic media. *J. Hazard. Mater.* **323**, 359–366, 2017.

FERNÁNDEZ, L. A.; ESTEVES V.I.; GOMES, N. C. M.; ALMEIDA, A.; CUNHA, Â. Biodegradation of 17β -estradiol by bacteria isolated from deep sea sediments in aerobic and anaerobic media. *Journal of Hazardous Materials.* 2017

FERNANDEZ-FONTAINA, E. Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Research*, v. 46, n. 16, p. 5434–5444, 2012.

FUJII, K.; KIKUCHI, S.; SATOMI, M.; USHIO-SATA, N.; MORITA, N. Degradation of 17β -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2057–2060, 2002.

GALVÃO, R. S. Drenagem urbana e planejamento ambiental: vale do Rio João Mendes (Niterói/RJ). 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geografia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin. Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environ. Int.* 37, 462–473, 2011.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; ARASHIRO L.; SANTOS, L.H.M.L.M.; INSA, S.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; FERRER, I.; GARFÍ, M. Fate of priority pharmaceuticals and their main metabolites and transformation products in microalgae-based wastewater treatment systems. *J. Hazard Mater.*, 390 (121771), 2020.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 8, n. 34, jan./jun. 2005.

GIORDANO, G. Tratamento e controle de efluentes industriais, Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ. 2004.

GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10² Ed. Editora McGrawHill, 2005.

GOMES, C.; FONSECA, M. Remoção de micropoluentes de interesse emergente em matriz aquosa por adsorção em carvão ativado em pó e superfino. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp, 2019.

GOMES, R.L.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J. N. Fate of conjugated natural and synthetic steroid estrogens in crude sewage and activated sludge batch studies, *Environ. Sci. Technol.* 43, 3612–3618. 2009.

GUILLETTE, L.J. Jr.; PICKFORD, D.B.; CRAIN, D.A.; ROONEY, A.A.; PERCIVAL, H.F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *General and Comparative Endocrinology*, v. 101, n. 1, p. 32-42, 1996.

HANSELMAR, T.A.; GRAETZ, D.A.; WILKIE, A.C. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review, *Environ. Sci. Technol.* 37, 5471–5478. 2003.

HERNANDEZ, J. M. Excess sludge reduction during activated sludge municipal wastewater treatment by integrating an anoxic holding tank and post-ultrasound treatment to enhanced biomass maintenance metabolism, Doctorate's thesis, The Ottawa-Carleton Institute for Environmental Engineering, Ottawa. 246p. 2012.

HILLER-STURMHÖFEL, S.; BARTKE, A. The endocrine system: an overview. *Alcohol Health Res World.* 1998;22(3):153-164, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br> - Consultado em: 08/05/2020

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. D. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc. Rural* 37, 1192–1201, 2007.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C.R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science & Technology*, v. 32, p. 2498-2506, 1998.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; Di CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent, *Sci. Total. Environ.* 256, 163– 173, 2000.

JOHNSON A. C.; WILLIAMS R.J. A model to estimate influente and effluent concentrations of estradiol, estrone and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environ Sci Technol* 38(13):3649–3658, 2004.

JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 12. Ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 777p. 1998.

KHANAL, S. K.; XIE, B.; THOMPSON, M. L.; SUNG, S.; ONG, S.; LEEUWEN, J. H. V. Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environment Science & Technology*, v. 40, n. 21, p. 6537 – 6546 – 6546, 2006.

KITCHENHAM, B.A.; CHARTERS, S. *Guidelines for performing systematic literature reviews in software engineering* – Elsevier, 2007.

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

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; Meyer, A.; *Cad. Saúde Pública*, 18, 435, 2002.

KURISU, F. OGURA, M. SAITOH, S. YAMAZOE, A. YAGI, O. Degradation of natural estrogen and identification of the metabolites produced by soil isolates of *Rhodococcus* sp. and *Sphingomonas* sp. *J Biosci Bioeng* 109: 576–582. 2010.

LEE, H. B.; LIU, D. Degradation of 17 α -etinilestradiol and its metabolites by sewagebacteria, *Water Air Soil Pollut.* 134, 353–368, 2002.

LEE, H. B., LIU D. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water Air Soil Pollut* 134:351–366. 2002.

LEITE, G. S. Caracterização, por espectrometria de massas, dos micropoluentes presentes no esgoto bruto e nos efluentes de um sistema de tratamento combinado anaeóbio-aeróbio. *Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)*, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2008.

LI, M.; ZHAO, X.; ZHANG, X.; WU, D.; LENG, S. Biodegradation of 17 β -estradiol by bacterial co-culture isolated from manure. *Sci. Rep.* 8, 1–8, 2018.

LIU, W.; CHEN, Q.; HE, N.; SUN, K.; SUN, D.; WU, X.; DUAN, S. Removal and biodegradation of 17 β -estradiol and diethylstilbestrol by the freshwater microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 1–14, 2018.

LIU, J.; XU, D.; LING, W.; LI, S.; CHEN, M. Isolation, Immobilization, and Degradation Performance of the 17 β -Estradiol-Degrading Bacterium *Rhodococcus* sp. JX-2. *Water Air Soil Pollution* 227, 2016.

LOPES, L. G., MARCHI, M. R. R, SOUZA, J. B. G. S, MOURA, J. A., Hormônios Estrogênicos no Ambiente e Eficiência das Tecnologias de Tratamento para Remoção em Água e Esgoto. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 13, n. 4, p. 123–131, 2008.

LUZIO, A.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.A.; MONTEIRO, S.M.; COIMBRA, A.M. Effects of 17 α -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. *Aquat. Toxicol.* 174, 22–35, 2016.

MANICKUM, T; JOHN, W. Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment Works in Pietermaritzburg (South Africa). *Science of the Total Environment*, v. 498 – 469, 2014.

MARAIS, G. V. R. and EKAMA, G. A. The activated sludge process. Part I – Steady state behavior. Research Report, Water Research Commission of South Africa, 12, 1975.

MARQUES, D. M. Terras Úmidas. Construídas de Fluxo Subsuperficial. In: CAMPOS, J. R. Tratamento de Esgoto Sanitário por Processo Anaeróbio e Disposição no Solo. Rio de Janeiro: ABES/PROSAB, p. 409 – 435, 1999.

MARONEZE, M. M.; ZEPKA, L. Q.; VIEIRA, J. G.; QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E. A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. *Rev. Ambient. e Água* 9, 445–458, 2014.

METCALF e EDDY. Tratamento de efluentes e recuperação de resíduos. 5th ed. New York: MetCalf e Eddy, Inc, 1819 p. 2015.

METCALF & EDDY. Wastewater Engineering: treatment and reuse. Nova Iorque, EUA, McGraw-Hill, 4ª Edição, 1815p. 2003.

MOREIRA, M.; AQUINO, S.; COUTRIM, M.; SILVA, J.; AFONSO, R. Determination of endocrine-disrupting compounds in Waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry. *Environmental Technology*, v. 32, n. 12, p. 1409 – 1417, 2011.

MONTEIRO, V. R. C.; VIDAL, C. M. de S.; SOUSA, J. B. de; CAVALLINI, G. S. Tratamento Terciário de Esgoto Sanitário Proveniente de Lagoa de Polimento Utilizando Sistema de Coagulação/Precipitação Seguido de Radiação Ultravioleta. *Semin. Ciências Exatas e Tecnológicas* 34, 67–80, 2013.

NAKAI, S. YAMAMURA, A. TANAKA, S. SHI, J. NISHIKAWA, M. NAKASHIMADA, Y. HOSOMI, M. Pathway of 17 β -estradiol degradation by *Nitrosomonas europaea* and reduction in 17 β -estradiol-derived estrogenic activity. *Environ Chem Lett* 9:1–6. 2011.

NATURE INDEX. the Nature Index publishes tables based on counts of high-quality research outputs in the previous calendar year, 2019.

NITERÓI. Lei nº 1157. Institui o Plano Diretor de Niterói. Niterói, RJ - 04 de fevereiro de 1992.

NITERÓI. Lei nº 1968. Institui o Plano Urbanístico da Região Oceânica, dispendo sobre diretrizes gerais, políticas setoriais, zoneamento ambiental, ordenação do uso e da ocupação do solo e aplicação de instrumentos de política urbana na região de Niterói, RJ - 05 de abril de 2002.

NGHIEM, L. D.; MANIS, A.; SOLDENHOFF, K.; SCHÄFER, A. I. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *J. Memb. Sci.* 242, 37–45 2004.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. *MultiCiência* 7, 1–19, 2006.

OMENA, J. J.; ROSA, J. M. Estudos no Facebook em Portugal: revisão sistemática dos métodos de investigação. *Commun. Stud.* 19, 15–33, 2015.

PASSOS, R. L. Seleção De Eficácias De Tratamento De Esgotos a Partir Da Utilização Combinada De Modelo De Qualidade De Água E De Técnica Meta-Heurística De Otimização, 2012.

PARK, J.B.K.; CRAGGS, R.J. Wastewater treatment and algal production in high-rate algal ponds with carbon dioxide addition *Water Sci. Technol.*, 61, pp. 633-639, 2010.

PELETEIRO, C. S.; ALMEIDA, M. L. Dimensionamento, Análise E Comparação Da Viabilidade Econômica De Uma Estação De Tratamento De Esgotos Utilizando Os Processos De Lodos Ativados Convencional E Aeração Prolongada. *Ufrj - Univ. Fed. Do Rio Janeiro - Esc. Politécnic* 1, 112, 2014.

PEREIRA, A. M. Condicionantes Institucionais para Bioprospecção no Brasil. *Instituto de Economia* ,1–290, 2009.

PEREIRA, R. O, ALDA, M., L., DANIEL, L. A., BARCELÓ, D. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, v. 82, n. 6, p. 789–99, fev. 2011.

PESSOA, G. D. P., SANTOS, A. B., SOUZA, N. C., ALVES, J. A. N., Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 968–973, 2012.

PESSOA, G.D. P. Avaliação de Desreguladores Endócrinos e do Micropoluente Colesterol em Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Fortaleza, 2012.

PAUWELS, B.; WILLE, K.; NOPPE, H.; BRADANDER, H.; WIELE, T. V.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. 17 α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol. *Biodegradation*, Springer, n.19, p. 683–693, 8 jan. 2008.

POOLE, J.E.P. A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works. *Water Research*, v. 18, n. 3, p. 281-287, 1984.

PURDOM, C.E.; HARDIMAN, P.A.; BYE, V.J.; ENO, N.C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. *Chemistry in Ecology*, v. 8, p. 275-285, 1994.

RABELLO, V. M.; TEIXEIRA, L. C. R. S.; GONÇALVES, A. P. V.; SALOMÃO, A. L. The Efficiency of Constructed Wetlands and Algae Tanks for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs): a Systematic Review. *Water, Air, Soil Pollut.* 230, 2019.

RECESA – Rede Nacional de Extensão e Capacitação Tecnológica em Saneamento Ambiental. Operação e manutenção de sistemas simplificados de tratamento de esgotos: Guia do Profissional em Treinamento – nível 1. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Belo Horizonte, 74p. 2008.

REIS FILHO, R. W. R.; VIEIRA, J. C. DE A. E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 817–822, 2006.

ROCHA, M. J.; CRUZEIRO, C.; ROCHA, E. Development and validation of GC-MS method for the evaluation of 17 endocrine disruptor compounds, including phytoestrogens and sitosterol, in coastal Waters – Their spatial and seasonal levels in Porto coastal region (Portugal). *Journal of Water and Health*, v.11, n. 2, p. 281 – 296, 2013.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M.J.L. de; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 1045, p. 85-92, 2004.

RODRIGUES, A. S. Poluentes e Fontes: Orgânicos. *Química das águas*. São Paulo, p.18. 2007.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. *Acta paulista de enfermagem*, v. 20, n. 2, p. v-vi, 2007.

ROUNDTREE, A. K. M. A.; KALLEN, M. A.; LOPEZ-OLIVO, B.; KIMMEL, B.; SKIDMORE, Z.; ORTIZ, V.; COX, M. E. Poor reporting of search strategy and conflict of interest in over 250 narrative and systematic reviews of two biologic agents in arthritis: A systematic review. *Journal of Clinical Epidemiology*. v. 62. n. 2. p. 128–137. 2008.

SABINO, J. A. Avaliação de risco ecológico decorrente da presença de micropoluentes na sub-bacia hidrográfica urbanizada do Rio João Mendes, Niterói – RJ. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), UERJ, 2018.

SACCARO JR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.

SALOMÃO, A. L. de S. Ocorrência e ecotoxicidade de desreguladores endócrinos químicos em ambientes aquáticos e em sistemas de tratamento de esgoto. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Meio Ambiente, Linnaeus University, Kalmar, 2014.

SAMPAIO, R. F. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. 2007.

SANCHEZ, D. C. O. Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná, 2006.

SANTOS, A. H. Aspectos Ambientais de Desreguladores Endócrinos Estrogênicos em Recursos Hídricos. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2016.

SANTOS, A. S. P. Tratamento de Águas Residuárias. Notas de aula – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2012.

SERRA-ROIG, M.P.; JURADO, A.; DÍAZ-CEUZ, M.S.; VAZQUEZ-SUÑE, E.; PUJADES, E.; BARCELÓ, D. Occurrence, fate and risk assessment of personal care products in river–groundwater interface. *Sci. Total Environ.* 568, 829–837, 2016.

SILVA, Giselle Gomes Moreira da. Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking Waters: a sewage-to-tap issue. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 206, n. 1-4, p. 57 – 67, 2010.

SOLÉ, M.; AIDA, M.; CASTILLO, M.; PORTE, C.; LADEGAARD-PEDERSEN, K.; BARCELÓ, D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface Waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology*, 34, 5076–5083, 2000.

SOUZA, N. C. de. Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil - Saneamento Ambiental) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SUMPTER, J.P. Xenoendocrine disruptors – environmental impacts. *Toxicology Letters*, v. 102, p. 337-342. 1998.

TOLLEFSON, J. China declared world's largest producer of scientific articles. *Nature magazine – Scientific American*, 2018.

TOSETTO, M. S – Tratamento terciário de esgoto sanitário para fins de reúso urbano. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

UNNITHAN, V. V.; ADRIAN, U.N.C.; SMITH, G. B. Role of Nannochloropsis salina for the recovery and persistence of MS2 virus in wastewater. *Algal Research*, [s.l.], v. 4, p.70-75, abr. 2014.

URAIKONG, C.; ALLAN, R. D.; LI, C.; KENNEDY, I. R.; WONG, V.; LEE, N. A. A survey of 17 α -ethinylestradiol and mestranol residues in Hawkesbury River, Australia, using a highly specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) demonstrates the levels of potential biological significance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 585–592, 2017.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Special report on environmental endocrine disruption: an effects and analysis. Cincinnati, Ohio, 1997.

VASSALLE, L.; DÍEZ-MONTERO, R.; MACHADO, A. T. R.; MOREIRA, C.; FERRER, I.; MOTA, C. R.; PASSOS, F. Passos. Upflow anaerobic sludge blanket in microalgae-based sewage treatment: Co-digestion for improving biogas production *Bioresour. Technol.*, 300, P. 9, 2020.

VIALI, A. M. Avaliação da eficácia de remoção de hormônios em estações de tratamentos de efluentes. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2014.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 2. ed. – Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; 1996.

VYMAZAL, J.; KROEPFELOVÁ, L. Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with Horizontal Sub-Surface Flow. *Environmental Pollution*, v. 14. Praga: Spinger, 566p, 2008.

WILSON, E.O. A situação atual da diversidade biológica. In: WILSON, E.O, Biodiversidade. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, pp. 3-24, 1997.

WEBER, S.; LEUSCHNER, P.; KÄMPFER, P.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 106–112, 2005.

YING, G.-G.; KOOKANA, R.S.; RU, Y.-J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.*, 28, pp.545-551. 2002.

YU, C.; DEEB, R. A.; CHU, K. Microbial degradation of steroidal estrogens. *Chemosphere* 91, 1225–1235, 2013.