



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Ericka Cardoso de Gois Ferreira

**Ficorremediação de 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em cápsulas de alginato**

Rio de Janeiro

2023

Ericka Cardoso de Gois Ferreira

**Ficorremediação de 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga *Chlorella vulgaris*  
imobilizada em cápsulas de alginato**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão

Rio de Janeiro

2023

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

F383 Ferreira, Ericka Cardoso de Gois.  
Ficorremediação de 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em cápsulas de alginato / Ericka Cardoso de Gois  
Ferreira. – 2023.  
59 f.

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

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Água - Purificação - Tratamento biológico - Teses. 3. Hormônios - Teses. 4. Algas - Teses. I. Teixeira, Lia Cardoso Rocha Saraiva. II. Salomão, André Luís de Sá. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 628.161.2

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

Ericka Cardoso de Gois Ferreira

**Ficorremediação de 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga *Chlorella vulgaris*  
imobilizada em cápsulas de alginato**

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

Aprovada em 30 de novembro de 2023.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira  
Faculdade de Engenharia – UERJ

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Chaves Intorne  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rachel Ann Hauser-Davis  
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

Rio de Janeiro

2023

## **DEDICATÓRIA**

Eu dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão.

## AGRADECIMENTOS

Eu agradeço aos meus pais pela criação e por todos os ensinamentos. Em especial, à minha mãe por sempre me incentivar a estudar, crescer, evoluir e por sempre me dizer para continuar durante os momentos que pensei em desistir desse objetivo. Por sempre me apoiar nas minhas escolhas profissionais e por torcer por mim.

Ao meu irmão, por ser parceiro, por acreditar sempre em mim e por vibrar junto comigo em todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado, por sempre me apoiar, me incentivar a continuar inúmeras vezes quando pensei em desistir ao longo do mestrado.

Aos meus colegas do Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e efluentes – LABIFI (Grazi, Adriana, Thainá, Sofia, Priscila e Rodrigo) por todo apoio e ajuda ao longo desse processo, seja nas análises, experimentos e até por tornarem essas experiências ainda melhores e descontraídas.

Aos meus amigos mais próximos que estudaram comigo na graduação, por todo incentivo ao longo desse período. À equipe do Serviço de Licenciamento de Saneamento (SESAN) do Instituto Estadual do Ambiente (INEA), por todo incentivo e em especial, à minha eterna chefe Raquel Sélos, por ser tão compreensiva ao longo desse período e por todo apoio. Sem isso, com certeza, não seria possível finalizar tal etapa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária (PEAMB), à Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e a todos os órgãos de fomento.

Aos meus professores do mestrado e em especial, aos meus orientadores, a professora Lia Teixeira e o professor André Salomão, sou muito grata por ter tido essa oportunidade de aprender com vocês ao longo dessa jornada e por todo apoio ao longo deste trabalho.



## RESUMO

FERREIRA, Ericka Cardoso de Gois. **Ficorremediação de 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga *Chlorella vulgaris* immobilizada em cápsulas de alginato**. 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Os micropoluentes emergentes são substâncias encontradas em baixas concentrações em matrizes aquáticas (ng mL<sup>-1</sup>), mas que podem causar inúmeros efeitos perturbadores nos organismos expostos, incluindo humanos. No entanto, como eles não são efetivamente removidos pelas tecnologias convencionais de tratamento de efluentes, estão cada vez mais presentes nos efluentes domésticos. Dentre estes, destaca-se o hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), amplamente utilizado em contraceptivos e terapias de reposição hormonal. Um recurso que pode ajudar a mitigar esses efeitos é a ficorremediação, onde espécies selecionadas de microalgas são empregadas no tratamento de efluentes, sendo capazes de remover ou biodegradar os contaminantes-alvo, como hormônios. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de remoção da microalga *Chlorella vulgaris*, immobilizada em cápsulas de alginato de sódio, do hormônio feminino sintético EE2. Inicialmente, foi realizado o encapsulamento da microalga com alginato de sódio para avaliar a capacidade da microalga permanecer viável e ser liberada lentamente no meio líquido. Feito isso, o crescimento das células foi acompanhado ao longo de 4 meses por contagem celular em câmara de Neubauer, e foi verificado aumento no número de células, indicando que a microalga permaneceu viável. Na segunda etapa, foi realizado um bioensaio, onde as microalgas encapsuladas foram expostas a 50 ug L<sup>-1</sup> de EE2 em água mineral por 96h. Paralelamente, foram conduzidos bioensaios controle com microalgas livres em água mineral e outro com apenas EE2 em água mineral. O bioensaio foi monitorado por contagem de células e concentração de EE2 por cromatografia líquida. Após os resultados, foi realizada análise estatística ANOVA com fator duplo de repetição e verificou-se que as algas livres tiveram melhor desempenho considerando as reduções nos tempos analisados, sendo uma redução final de 75%, já as algas encapsuladas em alginato de sódio tiveram uma redução de 49% de EE2 após 96 horas de experimento, as amostras de cápsulas de alginato de sódio e água (controle) também tiveram eficiência de remoção do hormônio. Os resultados sugerem que esta metodologia de encapsulamento de microalgas pode ser viável para a remoção de micropoluentes, sobretudo o hormônio EE2.

Palavras-chave: Alginato de sódio; Hormônio feminino sintético; Encapsulamento de microalgas; 17-alfa etinilestradiol; *Chlorella vulgaris*.

## ABSTRACT

FERREIRA, Ericka Cardoso de Gois. **Phycoremediation of 17-alpha ethinyl estradiol (EE2) by the microalgae *Chlorella vulgaris* immobilized in alginate capsules**. 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Micropollutants of emerging concern are substances found in low concentrations in aquatic matrices (ng/L), but they can cause numerous disruptive effects on exposed organisms, including humans. However, since they are not effectively removed by conventional wastewater treatment technologies, they are increasingly present in domestic effluents. Among these, the synthetic hormone 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) stands out, widely used in contraceptives and hormone replacement therapies. The use of selected species of microalgae has been studied and applied in effluent treatment as a potentially effective method for the removal or biodegradation of target contaminants such as hormones. Thus, the present study aimed to evaluate the removal capacity of the microalga *Chlorella vulgaris*, immobilized in sodium alginate capsules, for the synthetic female hormone 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). Initially, the microalga was encapsulated with sodium alginate to assess the ability of the microalga to remain viable and be slowly released into the liquid medium after the encapsulation process. After the encapsulation process, the growth of microalgal cells was monitored over 4 months through cell counting in a Neubauer chamber, and an increase in the number of cells was observed, indicating that the microalga remained viable. In the second stage, a bioassay was conducted, where the encapsulated microalgae were exposed to 50  $\mu$ g/L of EE2 in mineral water for 96 hours. Parallel control bioassays were conducted with free microalgae in mineral water and with EE2 alone in mineral water. The bioassay was monitored using cell count and EE2 concentration measured by liquid chromatography. Following the results, an ANOVA statistical analysis was conducted with a double replication factor. It was observed that free algae exhibited better performance in terms of reductions during the analyzed periods, achieving a final reduction of 75%. Meanwhile, algae encapsulated in sodium alginate showed a 49% reduction in EE2 concentration after 96 hours of experimentation. Samples of sodium alginate capsules and water (control) also demonstrated hormone removal efficiency. These findings suggest that the encapsulation methodology of this microalgae may be viable for the removal of micropollutants, particularly the hormone EE2.

Keywords: Sodium alginate; Synthetic female hormone; Microalgae encapsulation; 17-alpha ethinylestradiol; *Chlorella vulgaris*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alguns compostos que atuam como desreguladores endócrinos.....	18
Figura 2: Estrutura química do hormônio 17 alfa-etinilestradiol (EE2) .....	21
Figura 3: “Peixinho gordo” ( <i>Pimephales promelas</i> ).....	22
Figura 4: Peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	22
Figura 5: Espécies de microalgas utilizadas no tratamento de efluentes.....	24
Figura 6: Formação das células filhas da microalga <i>C. vulgaris</i> a partir da célula mãe.....	25
Figura 7: Incubadora para cultivos de microalgas em condições ambientais controladas.....	35
Figura 8: Etapa de formação das microesferas de alginato de sódio e microalgas e microesferas de alginato e água (controle) com a utilização da bomba peristáltica.....	36
Figura 9: Ensaio de viabilidade do encapsulamento das microalgas em alginato de sódio .....	37
Figuras 10 A e B: Microalga <i>C. vulgaris</i> encapsulada em alginato de sódio – microscópio óptico e visão das cápsulas em meio aquoso.....	37
Figura 11: Representação da câmara de Neubauer utilizada para a contagem das células de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	38
Figura 12: Ensaio das amostras, em triplicata (n=3), contendo somente água mineral e hormônio EE2 (amostras B), <i>C. vulgaris</i> e EE2 (amostras A), água mineral, cápsulas de alginato de sódio e EE2 (amostras C), e água mineral, <i>C. vulgaris</i> encapsulada em alginato de sódio e EE2 (amostras D) .....	39
Figura 13: Cromatógrafo em fase líquida de Ultra performance (UPLC, Waters ACQUITY®) localizado no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e efluentes (LABIFI).....	40

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação do número de células de mL-1 ao longo do tempo, nos meios 01 e 02.....	41
Gráfico 2: Análise do processo de degradação do hormônio EE2 ao longo do período de 96 horas.....	42
Gráfico 3: Relação entre a densidade da microalga livre, <i>C. vulgaris</i> com a redução da concentração de 17-alfa etinilestradiol (EE2) ao longo do tempo de experimento.....	47
Gráfico 4: Representação gráfica da relação entre a densidade algal de <i>C. vulgaris</i> encapsulada e a redução da concentração de 17-alfa etinilestradiol (EE2) ao longo do tempo de ensaio .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Redução percentual da concentração inicial de EE2 ao longo do tempo.....	43
Tabela 2: Comparativo entre a degradação do EE2 na presença da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> livre e a degradação do hormônio na sua ausência.....	44
Tabela 3: Comparativo entre a redução da concentração de EE2 por meio da ação da <i>Chlorella vulgaris</i> encapsulada em alginato de sódio, e o controle da degradação.....	44
Tabela 4: Valores médios de concentração de EE2 (ug L-1) e densidade algal de <i>Chlorella vulgaris</i> (células mL-1) .....	47
Tabela 5: Decaimento da densidade da microalga encapsulada em alginato de sódio, <i>Chlorella vulgaris</i> e a redução da concentração de EE2 ao longo das 96 h de experimento .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BPF	Bisfenol F
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
2,4-DCF	2,4-Diclorofenol
E1	Estrona
E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	Estriol
EDC	Desreguladores Endócrinos
EE2	17-alfa etinilestradiol
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
LABIFI	Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e efluentes (LABIFI)
NP	Nonilfenol
O <sub>3</sub>	Ozônio
pH	Potencial de Hidrogênio
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
4-OP	4-Octilfenol
TBT	Tributilestanho
TPT	Trifenilestanho
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UV	Radiação Ultravioleta
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
VTG	Vitelogenina
ZRP	Zona Radiata
VTG	Vitelogenina

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
1.1	<b>Geral</b> .....	15
1.2	<b>Específicos</b> .....	15
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	<b>Micropoluentes emergentes</b> .....	16
2.2	<b>Desreguladores Endócrinos</b> .....	17
2.2.1	Estrogênios.....	20
2.2.1.1	Hormônio 17-alfa etinilestradiol.....	21
2.3	<b>Microalgas</b> .....	23
2.3.1	<u>Caracterização da microalga <i>Chlorella vulgaris</i></u> .....	25
2.4	<b>Sistemas de Tratamento de Efluentes</b> .....	26
2.4.1	<u>Metodologias de remoção de EDCs</u> .....	27
2.5	<b>Ficorremediação de hormônios por ação de microalgas</b> .....	30
2.6	<b>Encapsulamento de microalgas em alginato de sódio</b> .....	32
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1	<b>Cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i></b> .....	35
3.2	<b>Produção de microesferas – encapsulamento</b> .....	35
3.3	<b>Ensaio de remoção/biodegradação do hormônio EE2</b> .....	38
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	50
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51

## INTRODUÇÃO

O crescimento das grandes cidades e o aumento na ocupação urbana (adensamento populacional) causado pelo crescimento econômico, migração e urbanização, de forma ordenada ou não, impacta de maneira significativa no aumento da demanda por recursos naturais, como alimentos, energia, matéria-prima e, sobretudo, a água, influenciando diretamente no aumento da produção de resíduos sólidos e efluentes domésticos e industriais (TEIXEIRA, 2013). Com isso, percebe-se o surgimento de uma série de problemas ambientais e de saúde pública. Os efluentes tornaram-se uma das principais fontes crônicas de poluição dos corpos hídricos, conferindo a estes um aumento no grau de poluição e uma alteração em suas características naturais, como a variação do pH, cor e cheiro, e acréscimo de sólidos suspensos, microrganismos e na carga orgânica, de fósforo e nitrogênio (JORDÃO e PESSOA, 1995).

O lançamento de esgoto em corpos receptores sem o tratamento adequado pode causar a eutrofização, que consiste em um processo de aumento da disponibilidade de nutrientes ocasionando o crescimento acelerado de plantas aquáticas, microalgas e outros microrganismos, incluindo patógenos. Outro grande problema é o lançamento de micropoluentes nos corpos hídricos, oriundos de efluentes domésticos e industriais (THOMANN e MUELLER, 1987).

Os micropoluentes compreendem diversas substâncias químicas presentes em produtos de higiene pessoal e limpeza, defensivos agrícolas, produtos cosméticos e farmacêuticos, plastificantes e compostos naturais. Estes podem causar inúmeros impactos tanto ao ambiente quanto aos seres vivos expostos, mesmo em baixas concentrações (AVILA et al., 2014). Dentre estas substâncias, destacam-se os desreguladores endócrinos (EDC), substâncias que conseguem afetar o sistema endócrino de humanos e outros animais. Os hormônios estrogênicos naturais, como o  $17\beta$ -estradiol (E2) e a estrona (E1), ou sintéticos, como o  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e o levonorgestrel, são os de ação mais direta e específicos neste processo, sendo estes diariamente excretados por mulheres, através da urina (BILA E DEZOTTI, 2007). Com isso, uma das principais rotas de chegada destes compostos nos corpos hídricos é via lançamentos diretos de efluentes (sem tratamento), ou provenientes de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) após o tratamento. Neste segundo caso, mesmo após o tratamento convencional de efluentes, estes hormônios ainda podem estar presentes, e mesmo em concentrações menores,

podem ser capazes de causar efeitos de toxicidade crônica em organismos aquáticos (HENRY e BLACK, 2008; MUNHOZ et al., 2009).

Sendo assim, é de suma importância que haja a diminuição dos lançamentos destes poluentes no ambiente, direcionando o tratamento de esgoto para remoção deles. Para que isso aconteça, as ETEs precisam investir em tratamento terciário eficiente com uma tecnologia viável do ponto de vista ambiental e socioeconômico. Há inúmeras tecnologias que estão sendo desenvolvidas para eliminar os EDC dos corpos d'águas, dentre elas, a fitorremediação, ou seja, o uso de metodologias de tratamento a partir da aplicação e o cultivo das microalgas (CRAGGS et al., 2012).

O uso desta tecnologia para o tratamento de efluentes e remoção/biodegradação de micropoluentes surge como alternativa, ainda em fase de estudos, desenvolvimento e aplicação, que têm se mostrado eficiente na remoção/biodegradação de hormônios estrogênicos (SOLE; MATAMOROS, 2016). Dentre as vantagens da fitorremediação, podemos citar: 1) configura-se um método de baixo custo no que diz respeito à infraestrutura e operação; 2) por ser um processo natural; 3) e a potencial de remoção de nutrientes e hormônios da matriz aquosa, uma vez que estes são incorporados na produção de biomassa algal. (CRAGGS et al., 2012).

Mais recentemente, com o objetivo de obter um maior rendimento na remoção de micropoluentes dos esgotos, a imobilização de bactérias e microalgas em capsulas de alginato de sódio têm se mostrado bastante interessante na remoção de alguns poluentes orgânicos e metais tóxicos da matriz aquosa (de-BASHAN e BASHAN, 2010). Esse processo tem apresentado cada vez mais visibilidade, pois de maneira geral, consegue elevar a eficiência do sistema como um todo e viabiliza a diminuição de custos inerentes aos processos biológicos. Dessa maneira, no presente estudo será utilizado a microalga *Chlorella vulgaris*, uma vez que esta é amplamente empregada em tratamento terciário de efluentes, principalmente no que toca a remoção de nutrientes, micropoluentes e metais tóxicos (CAO et al., 2020; GIESE, 2015; SAFI et al., 2014).

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da microalga *Chorella vulgaris* imobilizada em cápsulas de alginato de sódio na remoção do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) em ensaios de bancada.

### 1.2 Objetivos Específicos

Estabelecer e implementar um método de encapsulamento de microalgas em alginato de sódio no laboratório;

Avaliar o efeito do encapsulamento da microalga em alginato de sódio sobre a capacidade de sobrevivência e produção de biomassa em meio aquoso;

Avaliar a ação da microalga encapsulada em alginato de sódio na remoção do hormônio EE2 em meio aquoso.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Micropoluentes Emergentes

Micropoluentes emergentes são substâncias químicas de origem antropogênica ou natural detectadas no ambiente em baixas concentrações. De acordo com Von Sperling (2005), os micropoluentes podem ser orgânicos e inorgânicos. Estes, em sua grande maioria, são considerados tóxicos, destacando-se os metais. Alguns destes metais podem ser dissolvidos em água, tal como a prata, chumbo, cromo, arsênio e cádmio, e concentram-se na cadeia alimentar, mesmo que em pequenas concentrações, e podem afetar os organismos que ficam nos níveis tróficos acima. Além desses, poluentes como flúor e cianetos são bastante relevantes para saúde pública. Nos efluentes, os micropoluentes inorgânicos podem estar presentes nos sólidos dissolvidos e sólidos em suspensão.

Os micropoluentes orgânicos podem ser originados por fontes antrópicas, como detergentes, defensivos agrícolas, lançamentos de efluentes industriais e produto dos processos de processamento e refinamento do petróleo; e fontes naturais, como vegetais (fenóis, lignina, celulose e tanino) e hormônios animais, incluindo humanos. (VON SPERLING, 2005). A presença destes poluentes, também denominados de poluentes emergentes, em corpos hídricos ganhou mais visibilidade no que tange a uma problemática ambiental, principalmente, nos últimos dez anos. Neste grupo, estão incluídos os pesticidas, produtos de higiene pessoal, fármacos, produtos químicos de origem industrial, esteroides e hormônios dentre outros (LUO et al., 2014). Além disso, esses micropoluentes podem ser encontrados no meio ambiente em concentrações muito baixas ( $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ ), em alguns casos, até mesmo abaixo dos limites detectáveis e, ainda assim, geram impactos à saúde humana, animal e ao meio ambiente num todo, o que traz uma grande preocupação relacionada ao tema (BILA E DEZOTTI, 2007). Estudos relatam que alguns grupos de micropoluentes necessitam de mais atenção, como os fármacos (BILA E DEZOTTI, 2007). Neste caso, destacam-se os antibióticos pelo potencial de selecionar bactérias resistentes no meio.

Considerando que os micropoluentes são difíceis de identificar no ambiente, houve a necessidade de se desenvolver métodos analíticos otimizados com o intuito de realizar a quantificação desses compostos em diferentes matrizes: solos, lodos biológicos, esgoto doméstico, águas residuais de ETEs, sedimentos marinhos, águas subterrâneas e superficiais.

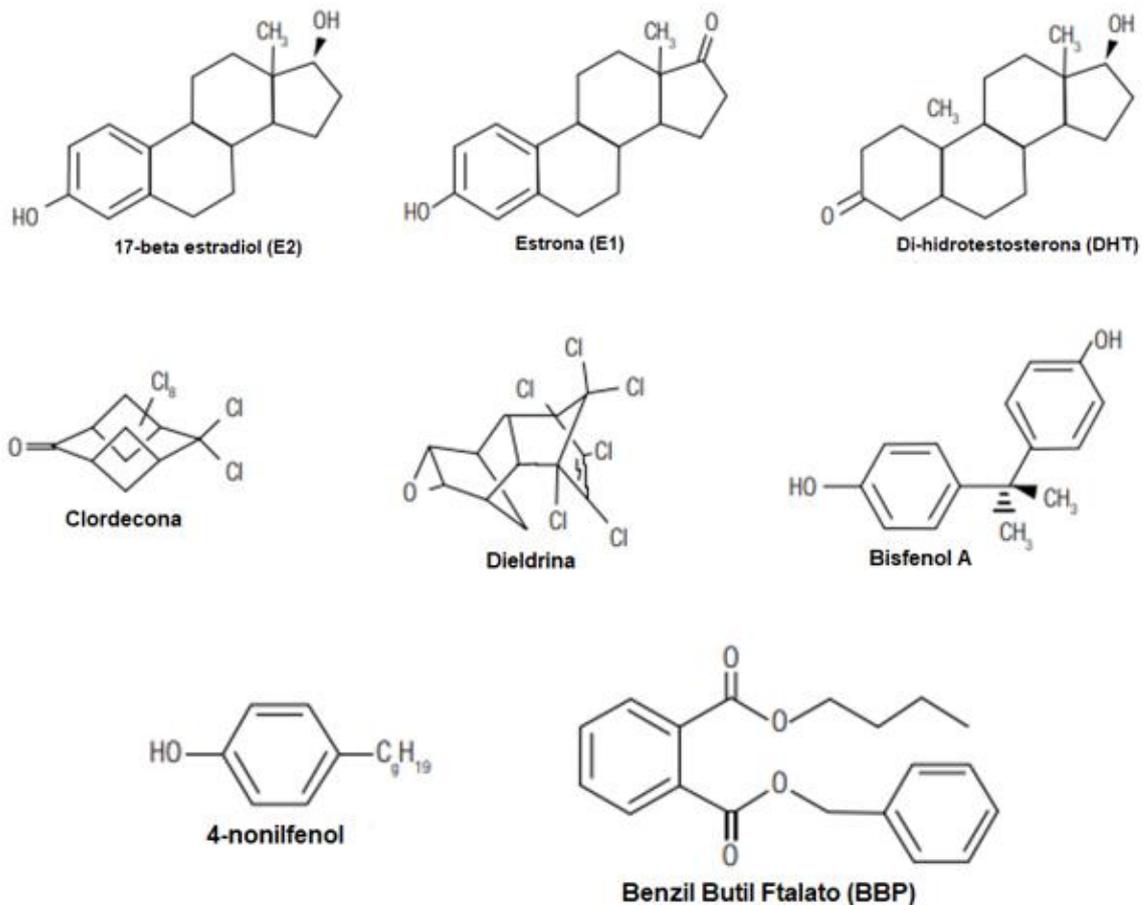
Ademais, o fato dos efeitos causados pelos micropoluentes ainda não serem totalmente conhecidos, colabora para que se haja uma necessidade maior em desenvolver metodologias de ensaios (*in vivo* e *in vitro*) a fim de detectar os efeitos biológicos causados por estas substâncias (BILA E DEZOTTI, 2007).

## 2.2 Desreguladores Endócrinos (EDCs)

Os desreguladores endócrinos (EDCs, do inglês *Endocrine Disrupting Chemicals*" (EDCs) são caracterizados como substâncias químicas que podem intervir diretamente no sistema endócrino de animais, incluindo os seres humanos (BILA E DEZOTTI, 2007; CZARNY, 2019). Dentre os EDCs, os hormônios possuem bastante destaque. Eles podem ser naturais ou sintéticos e são encontrados em diversas matrizes, como: águas superficiais e subterrâneas, solo, sedimentos, águas residuais tratadas ou não, e escoamento de água proveniente de atividade agrícola. Com relação aos naturais, pode-se citar: estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3), já com relação aos sintéticos, temos como exemplo o 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) (CHANG et al., 2009; LIU et al., 2012). Já foi reportado em alguns estudos a detecção e identificação de estrogênios sintéticos e naturais em efluentes domésticos sem tratamento e pós-tratados em ETEs de países como Brasil, Canadá e Alemanha, no caso dos sintéticos, foi identificado o EE2, e os naturais foram encontrados o E1 e o E3 (TERNES et al., 1999).

As faixas de concentração média dos micropoluentes presentes nesses corpos hídricos provenientes de lançamentos de esgoto sem tratamento ou tratado sem a remoção eficientes destes compostos foi de 0,02 e 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a concentração média para efluentes oriundos de ETE foi de 0,1 a 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . No Rio de Janeiro, em 1997, na ETE Penha, foi constatado a presença de estrogênios sintéticos e naturais, sendo uma concentração de 0,021  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente para o 17 beta-estradiol e estrona, no efluente bruto (TERNES, 1999). Na Figura 01 a seguir, é possível verificar as estruturas químicas de alguns compostos considerados como desreguladores endócrinos.

Figura 01: Alguns compostos que atuam como desreguladores endócrinos.



Fonte: Adaptado de Bolger (1998).

Grande parte das substâncias caracterizadas como EDCs são persistentes no ambiente, o que significa que são acumuladas nos sedimentos dos rios, possibilitando que sejam transportadas para distante de suas fontes receptoras, também são acumuladas no solo e na cadeia trófica, o que gera um grande risco à saúde de organismos topos da cadeia (MEYER et al, 1999).

Estes compostos podem causar inúmeras doenças, alterações das funções metabólicas e gerar condições ambientais e saúde precárias, tendo em vista que mesmo que os hormônios estejam em pequenas quantidades, eles exercem papéis importantes em funções vitais dos seres humanos e já no caso das exposições às substâncias EDCs no geral, mesmo que por algum período da vida e baixos níveis, podem acarretar impactos significativos e até permanentes, à saúde humana e animal (TEDX, 2018).

Com relação às formas de exposição aos EDCs, isso pode ocorrer de diversas maneiras, considerando que anualmente, são lançadas no ambiente uma quantidade muito expressiva de substâncias naturais e sintéticas, e grande parte destas são caracterizadas como EDCs. Essas

exposições podem ocorrer por meio do ar, alimentos, água ou até contato com solo, dentre outras fontes (BILA E DEZOTTI, 2007). É estimado que os seres humanos absorvem mais de 90% desses compostos ambientais através da via digestiva, sobretudo por alimentos contaminados. Essa contaminação é facilitada pelo fato de os EDCs serem solúveis em gorduras, dessa forma, acabam contaminando alimentos como leite e seus derivados; ovos; peixes e carnes (BILA E DEZOTTI, 2007).

Ademais, outra forma de contaminação se dá através da utilização de hormônios na criação de animais para consumo humano, mesmo que seja uma prática proibida em alguns países. Há alguns relatos referentes a tal questão, tratando-se da presença de hormônios como E2, testosterona e progesterona e estrona em carnes através da criação de porco, aves, peixes e gado; em plantas, leites e seus derivados também (HARTMANN et al., 1998).

Os EDCs podem causar uma série de impactos no ambiente, porém esses efeitos não dependem apenas da sua concentração, outros fatores como a persistência da lipofilidade, tempo de exposição, mecanismos de bioacumulação, eliminação e biotransformação devem ser levados em consideração, uma vez que algumas dessas substâncias vão se modificando no meio, gerando metabólitos ou subprodutos que podem ser até mais nocivos do que as substâncias iniciais. (ESPLUGAS, et al., 2007; BILA E DEZOTTI, 2007).

Dentre alguns efeitos que podem ser causados no meio ambiente, animais e seres humanos por esses compostos (JORGENSEN, 2000; CASTRO, 2002; FOLMAR, et al., 2000), podem ser citados os seguintes:

- **Alterações no desenvolvimento de animais** – os EDCs podem afetar o sistema hormonal e reprodutivo dos animais, gerando alterações no desenvolvimento sexual, reprodução e no crescimento, podendo causar também a diminuição da fertilidade ou a feminização de peixes machos;
- **Alterações no meio ambiente e biodiversidade** – alguns estudos relatam que não é muito conhecido os efeitos destes compostos no ambiente, principalmente em ambientes aquáticos, entretanto sabe-se que o efeito pode ocorrer em diversos níveis, sejam em células, órgãos, organismos, população e ecossistema, porém não se sabe quais organismos exatamente são impactados, o que se conhece é que pode afetar toda uma dinâmica populacional e cadeia alimentar de um ecossistema;
- **Poluição dos corpos hídricos** – muitos EDCs são lançados nos rios, lagos e oceanos por meio de descargas industriais ou domésticas, e são solúveis em água, afetando a qualidade da água;
- **Problemas de saúde humana** – a exposição a EDCs pode afetar a saúde humana de diversas maneiras, a depender do tempo de exposição e da dosagem e já foi associado esses compostos

à alguns problemas: câncer de mama, próstata e testicular; redução da fertilidade masculina, problemas na tireoide, distúrbios reprodutivos e ovários policísticos.

Em suma, os EDCs são substâncias químicas que podem ter impactos significativos no meio ambiente e na saúde humana. Assim, é importante que haja esforços para reduzir a exposição a essas substâncias, tanto através da regulamentação do uso de produtos químicos quanto através de mudanças de comportamento individuais, como a escolha de produtos menos tóxicos e o consumo consciente.

### 2.2.1 **Estrogênios**

Os hormônios sexuais podem ser categorizados em hormônios sexuais femininos (ou estrógenos), hormônios sexuais masculinos (ou andrógenos) e hormônios da gravidez (progestógenos). Dessa forma, os estrógenos naturais são hormônios esteróides lipossolúveis, que podem ser formados por meio da acetilcoenzima-A ou do colesterol (SIMMONDS, 1992).

O estrogênio é um hormônio sexual que pode ser produzido de forma natural através dos organismos ou sintetizado de forma industrial como fármacos. Os estrogênios naturais são produzidos pelos ovários e em baixas quantidades pelas glândulas adrenais, que são consideradas como glândulas endócrinas por expelirem hormônios na corrente sanguínea. Dentre os estrogênios naturais, destacam-se: E2, estriol e estrona, que são produzidos por todos os seres vertebrados, incluindo os humanos (U.S.EPA, 2011).

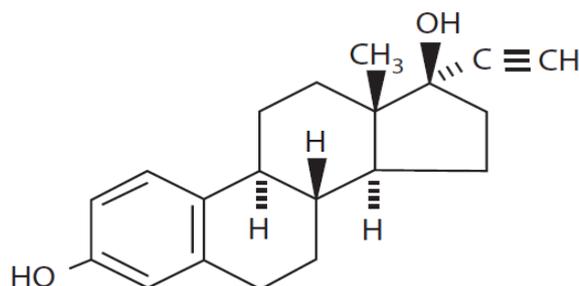
Já os estrogênios sintéticos são desenvolvidos quimicamente, similares aos hormônios que o corpo produz naturalmente, para fins contraceptivos (ONCOGUIA, 2016). Ademais, são utilizados no tratamento de cânceres, como de mama, endométrio e próstata. Dentre os hormônios sintéticos, pode-se destacar o EE2, tendo em vista que ele é bastante usado na produção de pílulas anticoncepcionais, bem como é um dos mais problemáticos no que tange questões ambientais com EDCs (BILA E DEZOTTI, 2007; YU et al., 2013).

Os estrogênios enquanto micropoluentes têm bastante relevância, considerando que já foram encontrados estrogênios naturais, como o estriol (E3), estrona (E1) e 17-beta estradiol (E2) em efluentes sem tratamento, em efluentes após passarem por tratamento e em águas superficiais e em águas tratadas. Bem como o estrogênio sintético, etinilestradiol também foi evidenciado no meio ambiente, entretanto em concentrações menores que os estrogênios naturais (ARAUJO, 2006).

### 2.2.1.1 Hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2)

O 17 alfa etinilestradiol (EE2) (Figura 2) é um dos principais causadores de reações endócrinas em organismos aquáticos, tendo em vista que é muito utilizado no desenvolvimento de medicamentos de reposição hormonal e contraceptivos orais (COMBALBERT & HERNANDEZ-RAQUET, 2010; CUNHA et al., 2016).

Figura 02: Estrutura química do hormônio 17 alfa-etinilestradiol (EE2).



Fonte: Walker (2012).

Ele é estruturalmente semelhante ao hormônio estradiol produzido pelo organismo feminino. Porém, o EE2 é mais potente do que o estradiol e mais resistente à degradação metabólica, o que significa que ele consegue permanecer ativo por mais tempo no corpo, bem como suas características o tornam persistentes no ambiente. Ele foi desenvolvido por meio da adição de um radical etinil à uma molécula de 17 $\beta$ -estradiol no carbono 17, que gera à molécula um maior potencial estrogênico com relação ao estradiol. O EE2 atua como um agonista dos receptores de estrogênio, promovendo a atividade estrogênica no corpo. Ele pode afetar o ciclo menstrual, inibindo a ovulação e colaborando para o aumento da espessura do muco cervical para evitar a fertilização. Além disso, tem efeito positivo na densidade óssea e pode atuar na prevenção da osteoporose. Porém, com o uso prolongado do EE2 pode aumentar o risco de efeitos colaterais, tais como: derrame, câncer de mama, coágulos sanguíneos e doença hepática. (COMBALBERT & HERNANDEZ-RAQUET, 2010; CUNHA et al., 2016).

O EE2 é excretado diariamente nos efluentes líquidos através da urina, principalmente de mulheres pela utilização dos contraceptivos. As pílulas contraceptivas são compostas por 30 a 50  $\mu$ g de EE2. De acordo com os dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), em 2006, no Brasil, 29% das mulheres utilizaram a esterilização feminina, que

consiste na contracepção definitiva para as mulheres que não desejam ter mais filhos, e 25% o uso do contraceptivo oral como formas de planeamento familiar, ressaltando que 81% das mulheres utilizam algum método para este planeamento (IBGE, 2006).

A presença do EE2 em corpos hídricos causa efeitos negativos na fauna aquática, tais como: redução da fertilidade, geração de deficiências reprodutivas, anomalias gonadais, influência negativa na maturação de ovos, indução de vitelogenina, sendo esta uma proteína que é sintetizada por todas as fêmeas ovíparas no momento do ciclo reprodutivo, feminização completa e formação de indivíduos intersexo com características sexuais secundárias femininas e masculinas (CZARNY et al., 2017; PENG et al., 2014).

Em experimento realizado no Canadá, um lago inteiro foi tratado com 5-6 ng L-1 de EE2, gerando um forte colapso em uma população de peixes, denominado peixinho gordo (*Pimephales promelas*) (Figura 3), sendo este impactado por um período de sete anos (KIDD et al; 2007). Ensaios em laboratório mostraram falhas reprodutivas no Peixe-zebra (*Danio rerio*) (Figura 4) quando expostos a 5 ng L-1 de EE2 durante toda a sua vida (NASH et al., 2004). Segundo LIANG et al (2017), a exposição de *D. rerio* a combinação de EE2 com levonogestrel gerou um efeito tóxico ainda maior do que quando exposto a um só hormônio.

Figura 03: “Peixinho gordo” (*Pimephales promelas*).



Fonte: <https://ncfishes.com/freshwater-fishes-of-north-carolina/pimephales-promelas/>

Figura 04: Peixe-zebra (*Danio rerio*).



Fonte: <https://www.zooplus.pt/magazine/peixes/especies-de-peixes/peixe-zebra-danio-rerio>

Para avaliação dos efeitos causados por hormônios em espécies de anfíbios, peixes e pássaros pode-se fazer o uso de biomarcadores, tais como a proteína da Zona Radiata (ZRP) e Vitelogenina (VTG), principalmente esta, considerando que é liberada na presença de estrogênios. A VTG é identificada exclusivamente em fêmeas, sendo uma proteína da gema feminina, entretanto pode ser também produzida por machos quando eles são expostos a estrogênios. Dessa maneira, a medição da VTG é considerada um importante biomarcador *in vitro* e *in vivo* de espécies que têm contato com águas poluídas por este desregulador endócrino (WALKER, 2012; HUMBLE et al., 2013; CHANDRA et al., 2012).

Sendo assim, considerando os impactos significativos que da presença de hormônios em corpos hídricos receptores pode causar não só a saúde humana, mas a animal também. Sendo de suma importância que haja um avanço em tecnologias que viabilizem e sejam eficientes nas remoções destes hormônios dos efluentes provenientes das ETEs e de outras formas de lançamento aos corpos receptores.

### 2.3 Microalgas

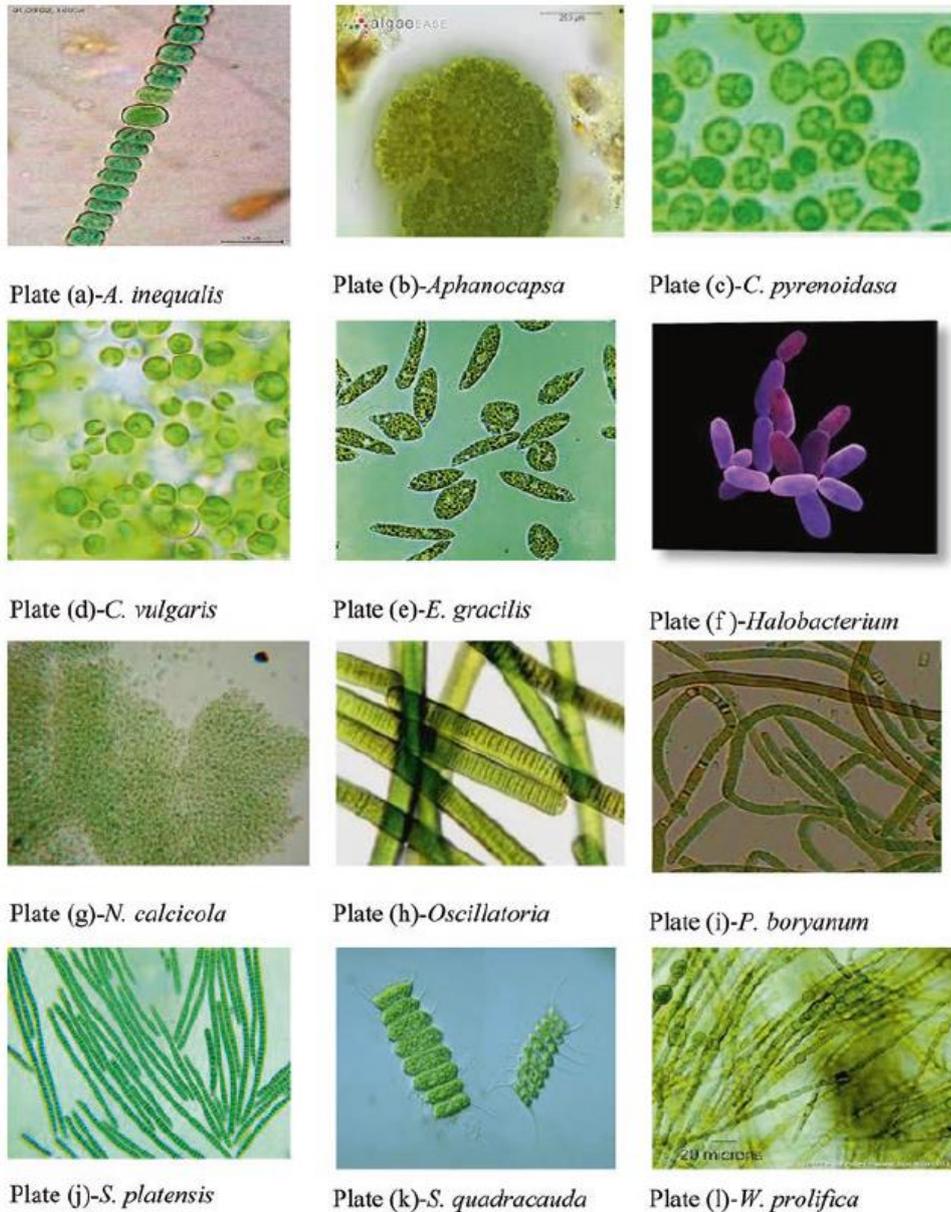
As algas são eucariotos autotróficos e aquáticos, de água doce ou marinho, capazes de efetuar a produção de energia por meio da fotossíntese, sendo divididas em dois grandes grupos: as microalgas e as macroalgas. Considerando o foco deste trabalho sendo em microalgas, a abordagem neste tópico será direcionada apenas para elas. São organismos unicelulares bastantes relevantes nos ambientes aquáticos, pois formam a base de grande parte das cadeias tróficas desse meio. A denominação “*micro*” está associada ao tamanho bastante reduzido, geralmente, variando entre alguns micrômetros até alguns milímetros de diâmetro (CHISTI, 2007; MORENO-GARRIDO, 2008).

Elas são consideradas organismos com alta taxa reprodutiva e apresentam diversas aplicabilidades biotecnológicas, incluindo o tratamento de efluentes. Microalgas podem ser encontradas em inúmeros habitats aquáticos, tais como: lagos, rios, oceanos; elas são capazes de se desenvolver em diferentes condições ambientais, incluindo variações na disponibilidade de nutrientes, temperatura, salinidade e pH (FURLAN et. al., 2020; CHISTI, 2007). Na biotecnologia, elas apresentam grande potencial, uma vez que são ricas em polissacarídeos,

proteínas, lipídios, vitaminas, ácidos graxos insaturados, glicerol e ésteres, devido à sua composição, são consideradas como matérias-primas adequadas para a preparação de bioetanol e biocombustíveis, além de serem fontes de compostos bioativos e nutricionais (CHOWDHURY e LOGANATHAN, 2019; BARROS DE MEDEIROS et al., 2021).

A figura 05 a seguir algumas espécies de microalgas que são utilizadas em processos biotecnológicos:

Figura 05: Espécies de microalgas utilizadas no tratamento de efluentes.



Fonte: SUKLA et al. (2019).

Para o crescimento e desenvolvimento, as microalgas precisam de água, luz e nutrientes, principalmente carbono, nitrogênio e fósforo. Parâmetros como intensidade luminosa, pH,

temperatura, disponibilidade de oxigênio e o controle de dióxido de carbono são importantes para o crescimento destes organismos (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010);

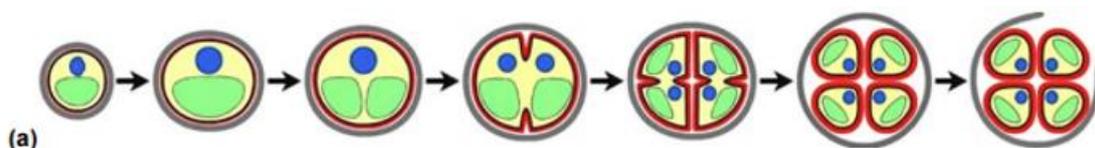
Elas são bastante importantes para o nosso ecossistema, uma vez que são responsáveis pela produção de grande parte do oxigênio atmosférico juntamente com cianobactérias por meio da fotossíntese, afetando, portanto, o ciclo global de carbono, captando o dióxido de carbono na atmosfera e dissolvido na água (SAYRE, 2010).

Podem ser utilizadas na produção de medicamentos, fertilizantes e possuem grande interesse comercial como um recurso renovável para pigmentos, proteínas, emulsificantes e agentes gelificantes que são utilizados em indústrias farmacêuticas; produção de bioplásticos, indústria alimentícias, cosméticos, produção de energia renovável. Elas têm sido constantemente estudadas como uma alternativa renovável e sustentável em comparação com outras matérias-primas, devido à sua rápida capacidade de crescimento e alta produtividade (HAMED, 2016; CHAUTON et. al., 2015).

### 2.3.1 Caracterização da *Chlorella vulgaris*

A microalga *C. vulgaris* faz parte do grupo *Chlorophyta*, sendo um organismo de água doce, geralmente é encontrada em lagos e lagoas, em superfícies úmidas, como potes de água, paredes e troncos de árvores, possuem uma forma esférica, com entre 2 e 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro (DUARTE, 2001; SAFI, 2014). Ela foi descoberta pelo microbiologista holandês Beijerinck e em algumas literaturas utilizam o nome Beijerinck como seu nome popular. É um microrganismo que tem uma reprodução assexuada e rápida, em um período de 24 horas, em boas condições, uma célula consegue se multiplicar por meio de autoesporulação (Figura 6), sendo esta uma forma de reprodução comum entre as espécies de algas (DUARTE, 2001; SAFI, 2014).

Figura 06: Formação das células filhas da microalga *Chlorella vulgaris* a partir da célula mãe.



Fonte: YAMAMOTO et al. (2005).

Segundo RAYMUNDO et al. (2005), *C. vulgaris* tem sua biomassa composta por proteínas (60 % p/p); lipídeos (11 % p/p); carboidratos (18 % p/p) e minerais (2-5 % p/p), podendo variar de acordo com as condições de processo e cultivo. O amido presente nos cloroplastos é formado por amilose e amilopectina, que atuam como reservas de energia na célula (SAFI et al., 2014). Segundo Klok (2014), *C. vulgaris* é capaz de armazenar lipídios em condições adversas de cultivo, como deficiência de nitrogênio e fósforo, além de acumular clorofila a e b,  $\beta$ -caroteno e xantofilas.

É possível desenvolver o cultivo autotrófico em fotobiorreatores fechados, que podem ser controlados em relação ao pH, temperatura, luminosidade e concentração de dióxido de carbono. Os produtos obtidos a partir desse tipo de cultivo são os mais indicados para uso em alimentos e cosméticos. Já o crescimento heterotrófico não requer luz, mas depende de uma fonte orgânica de carbono. Para cultivar *C. vulgaris* dessa maneira, as fontes orgânicas mais utilizadas são glicose, acetato, glicerol e glutamato (SAFI et al., 2014; KLOK, 2010).

No cultivo mixotrófico associado a essa microalga, pode usar técnicas tanto autotróficas quanto heterotróficas, favorecendo o processo de fotossíntese enquanto recebe fontes orgânicas de carbono. Ademais, estão sendo estudadas técnicas de crescimento alternativas que envolvem o uso de *C. vulgaris* com bactérias imobilizadas. Isso pode aumentar o tamanho das células, a produção de lipídeos e a remoção de metais de águas residuais, entre outras aplicações. Cabe mencionar que, algumas pesquisas indicam que a microalga utiliza o CO<sub>2</sub> proveniente da respiração das bactérias para seu crescimento (SAFI et al., 2014). *C. vulgaris* é bastante utilizada no tratamento terciário de efluentes, na maioria das vezes, visando a remoção de fósforo, nitrogênio, metais e micropoluentes (SAFI et al., 2014).

## 2.4 Sistemas de Tratamento de Efluentes

Durante o processo de dimensionamento das ETEs devem ser levados em consideração quais são os objetivos do tratamento do efluente, caracterização da área, bem como os impactos ambientais que os despejos irão causar. Os sistemas de tratamento são classificados conforme os níveis de tratamento, sendo, basicamente: tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. Neste último é onde geralmente ocorre a remoção dos micropoluentes, como os hormônios (VON SPERLING, 2005).

O tratamento preliminar é a etapa em que ocorre a remoção dos sólidos grosseiros, como areia, bem como é realizada a medição da vazão, que é bastante relevante para a quantificação do efluente a ser tratado. Nesta etapa, utiliza-se processos físicos; já no tratamento primário o principal objetivo é a remoção de sólidos sedimentáveis em suspensão e da matéria orgânica, utilizam-se mecanismos físicos e químicos; no tratamento secundário ocorre a remoção de matéria orgânica solúvel em suspensão, que não foram removidos nas etapas anteriores, por meio de tratamento biológico, e em alguns casos, nutrientes, como o fósforo e nitrogênio. No tratamento terciário, ocorre a remoção de nutrientes, patógenos e poluentes específicos, geralmente são os não biodegradáveis e tóxicos, também tem como objetivo remover poluentes que anteriormente não foram removidos de maneira satisfatória, atuando como um tratamento complementar, a presença ou não desta etapa está ligada ao objetivo do efluente pós-tratado (JORDÃO e PESSOA, 2005).

Conforme dito anteriormente, as ETEs, principalmente brasileiras, utilizam os processos biológicos como principal metodologia de tratamento de efluentes, não implementando outros métodos adjuntos de tratamento. Com isso, mostra-se que estes sistemas de tratamento tendem a não remover os micropoluentes de forma eficiente (USEPA 2008).

#### 2.4.1 Metodologias de remoção de EDCs

O fato dos efluentes mesmo após serem submetidos a processos de tratamento de esgoto nas ETEs e as fontes de água potável ainda possuírem compostos como os desreguladores endócrinos indica que há uma grande necessidade de estudo das metodologias de tratamento, bem como sua eficiência na remoção desses poluentes. Dentre os processos, os oxidativos e a ozonização são os mais destacados no que tange a oxidação desses compostos das águas residuais domésticas (BILA E DEZOTTI, 2007). Existem inúmeras metodologias de remoção de micropoluentes de efluentes, abaixo destacamos algumas:

- **Sorção:** é definida pelo processo de transferência entre substâncias com duas fases distintas, normalmente, sólida e líquida, ou gasosa. A mudança de massa ocorre e em seguida, as substâncias se unificam em uma única fase, seja líquida ou sólida (AQUINO et al., 2013).

- **Fotodegradação:** é um processo que pode acontecer de forma indireta ou direta, quando a molécula do poluente passa por processo de rompimento por exposição à radiação ultravioleta (UV), denominada fotodegradação direta. Já a indireta, ocorre igualmente, entretanto, depois do rompimento das moléculas, há a formação de radicais livres que conseguem reagir com outros micropoluentes, realizando o processo de degradação destes (AQUINO et al., 2013).

- **Volatilização:** é um processo em que há mudança do estado líquido ou sólido para o gasoso. Entretanto, não é muito utilizado no que toca a remoção dos desreguladores endócrinos, pois eles possuem estruturas com grandes massas molares e por isso, não são tão voláteis. Por fim, as alterações biológicas são os mecanismos utilizados em tratamento de efluentes líquidos que têm como base os processos que ocorrem naturalmente. Isso influencia bastante em melhorias no que tange a estabilização da matéria orgânica e outros compostos que estão no meio ambiente, melhorias como: melhor eficiência e velocidade dessa estabilização. Ressalta-se que estes processos podem ocorrer na ausência de oxigênio, denominados anaeróbios ou na presença dele, denominados aeróbios (SUÁREZ et al., 2008).

- **Oxidação avançada e ozonização:** é um processo em que se utiliza de reações químicas para transformar os micropoluentes em compostos que sejam menos tóxicos, geralmente envolve a utilização de oxidantes fortes, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ozônio ( $O_3$ ). Para oxidar os contaminantes presentes na água, eles reagem com os compostos orgânicos e micropoluentes, quebrando suas moléculas em fragmentos menores. Geralmente, os processos relacionados a oxidação têm a capacidade de gerar subprodutos, que ainda podem apresentar baixa atividade, sendo a remoção destes em uma etapa seguinte com carvão ativado ou filtração biológica (HERNÁNDEZ-LEAL, 2011). A oxidação avançada também pode envolver a utilização de radiação ultravioleta (UV) para aumentar a eficácia do processo de oxidação. Quando a água é exposta à radiação UV, ela se torna mais reativa, o que aumenta a eficácia dos oxidantes e acelera a degradação dos micropoluentes. Nos casos em que os processos envolvem a radiação UV, alguns estudos relataram que o potencial médio de degradação é de 46% das concentrações iniciais nos casos em que se trata de micropoluentes como biocidas, pesticidas e fármacos. Além disso, para alguns compostos como o diuron, diclofenaco, ácido mefenâmico e oacetopropeno foi relatada a uma degradação acima de 99% (LUO et al, 2014a; KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009);

- **Filtração por membranas:** É uma técnica que usa membranas para separar partículas e moléculas da água. Faz-se necessário mencionar que a nanofiltração e a osmose reversa possuem uma elevada eficiência na remoção de poluentes, sendo bastante relevantes e utilizadas na reutilização de água dentro da indústria. A osmose apresenta resultados mais interessantes quando comparado a ultrafiltração e isso se dá devido a estrutura que possibilita uma menor passagem para os micropoluentes (GARCIA-PACHECO, 2015). Quando se trata da utilização das membranas, o processo pode ocorrer por meio da adsorção – quando o micropoluinte fica aderido à camada externa da membrana e esta é retida; por exclusão – quando o poluente não consegue passar pela membrana, pois seu tamanho é superior; por interação entre soluto-soluto – quando dois solutos ficam juntos, conseqüentemente seu tamanho aumenta, dessa forma ficam retidos por causa da interação entre as camadas de incrustação e o tamanho dos poros; e por fim, por meio da repulsão de carga – quando o micropoluinte possui uma carga diferente da membrana carregada, gerando a repulsão do poluente (LUO et al., 2014b);

- **Processos biológicos:** estas tipologias de tratamento ocorrem por meio da utilização de agentes microbiológicos, tais como bactérias, protozoários e algas (como será abordado neste trabalho). Dentre os tratamentos biológicos podemos citar os lodos ativados e os filtros biológicos em reatores anaeróbios, como o UASB, já amplamente utilizadas em plantas de ETEs no Brasil. Tratamentos terciários utilizando biorremediação microbiana, fitorremediação em *Wetlands* construídos e a ficorremediação vem sendo cada vez mais exploradas no intuito de buscar soluções economicamente viáveis para a remoção dos micropoluentes. A escolha do tratamento biológico depende do tipo de micropoluinte, da concentração, do local de contaminação e das condições ambientais. Muitas vezes, uma abordagem combinada pode ser mais eficiente.

- **Adsorção:** é uma técnica que usa materiais adsorventes, como carvão ativado ou zeólitos, para remover os micropoluentes da água. Os micropoluentes são atraídos para a superfície dos materiais adsorventes e aderem a eles. Nesse processo, uma substância, líquida, sólida ou gasosa fica aderida ao material adsorvente líquido. A adesão das moléculas acontece por forças físicas e químicas, sendo essa capacidade de adsorção influenciada por inúmeros fatores, como pH, temperatura, área superficial e agitação;

- **Eletrocoagulação:** a técnica de eletrocoagulação consiste em passar uma corrente elétrica através da água, provocando uma desestabilização na solução e a coagulação dos contaminantes presentes. Esses contaminantes são submetidos a campos elétricos intensos que geram reações de oxi-redução, transformando-os em compostos químicos menos reativos, insolúveis e mais estáveis. Dessa forma, são formados flocos insolúveis que se agregam e podem ser removidos por sedimentação, flotação ou filtração. Os equipamentos de eletrocoagulação podem ser instalados em plantas já existentes, utilizando tanques que já estão construídos, ou por meio de tanques removíveis feitos de fibra ou lona. Também é possível utilizar construções modulares definitivas ou temporárias (GARCIA-SEGURA, 2017).

## 2.5 Fitorremediação de hormônios por ação das microalgas

A utilização de algas, sejam elas macro ou microalgas na biotransformação, remoção ou mineralização de poluentes, sejam metais, nutrientes e xenobióticos de efluentes é denominada de fitorremediação. Durante o processo de tratamento envolvendo algas, o nitrogênio, fósforo, carbono ou outros sais são usados pelas microalgas como fonte de nutrientes. Esse processo também possui eficiência no que toca a degradação de micropoluentes, como hormônios. (MULBRY *et al.*, 2008). Elas são capazes de absorver e metabolizar diversos compostos químicos, como metais, hidrocarbonetos e nutrientes em excesso, podendo transformá-los em compostos menos tóxicos ou inertes (MATAMOROS *et al.*, 2015).

De acordo com SINGH *et al.* (2019), dentre as vantagens em utilizar de sistemas de remoção de poluentes com microalgas, em comparação com outros métodos, cita-se:

- Podem ser cultivadas em escalas numerosas com baixos custos de implementação e manutenção;
- Possuem a capacidade de serem cultivadas e sobreviverem em condições de ambientes tóxicos, elas conseguem se ambientar a condições extremamente difíceis, com resistência à toxicidade dos poluentes e removendo-os de forma eficiente de corpos hídricos;
- Após o processo, suas enzimas podem ser utilizadas como matéria-prima para produção de biocombustível;
- Não causam danos ao meio ambiente e aos seres vivos;

- Aumento da concentração de oxigênio dissolvido devido ao processo de fotossíntese, facilitando a absorção de nutrientes pelo corpo hídrico (DE LA NOÛE *et al.*, 1992; PHANG, 1990; DASGUPTA *et al.*, 2019).

Cabe ressaltar que durante o processo de tratamento com utilização de microalgas, o fornecimento de nutrientes para estas pode atuar como catalisador para acelerar o processo de degradação dos poluentes, aumentar a eficiência do tratamento e remover mais rápidos os compostos. (ZHANG *et al.*, 2016).

Pode-se abordar como algumas limitações da utilização da fitorremediação com microalgas, ser um processo lento, que necessita de um longo tempo para remediação completa das substâncias poluentes; manutenção das condições ambientais ótimas para o crescimento, como luz e temperatura. Ademais, nos sistemas de tratamento que contenham tanques com microalgas pode também conter outros microrganismos, podendo liberar um odor fétido criando um ambiente desagradável (ZHANG *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2019). Em alguns casos, há uma dificuldade em produzir um inóculo de algas puro e o crescimento e desenvolvimento das algas são específicos de uma determinada área, uma vez que dependem das condições ambientais; a dificuldade em que o tratamento com microalgas tem de ser tornar uma metodologia universal, tendo em vista que necessita de uma área grande para a construção de tanques para as algas em larga escala, tanto que alguns estudos abordam um empenho em desenvolvimento de culturas de algas hiperconcentrada, viabilizando o problema anterior (DE PAUW E VAN VAERENBERGH, 1983) e a necessidade de verificação de atendimento às condições de área; a coleta da biomassa também é considerado como um gargalo do processo, e por fim, a profundidade das lagoas deve ser pensada para obtenção de luz solar de maneira adequada, para elas não ficarem totalmente na sombra (DASGUPTA *et al.*, 2019).

Um estudo realizado na Índia sobre a utilização de microalgas no tratamento de esgoto municipal apontou alguns benefícios do uso dessa metodologia, demonstrando que os gargalos do sistema de tratamento convencional de ETEs podem ser resolvidos com a metodologia de tratamento com microalgas (DASGUPTA *et al.*, 2019). Como benefícios, foi apresentado que as microalgas são hábeis para realizar a remoção de todos os tipos de poluentes, mesmo que a eficiência mude conforme os nutrientes que serão removidos; os sistemas de tratamento com microalgas é 100% ecológico e dessa forma, não gera poluição secundária proveniente da utilização de produtos químicos, como nos casos dos métodos convencionais (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012).

Durante o processo de tratamento utilizando microalgas, alguns mecanismos fazem parte desse processo, tais como a adsorção, sorção e absorção. A adsorção pode ser definida

como o processo de adesão de substâncias em uma superfície adsorvente, sem que uma seja incorporada no volume da outra; a absorção pode ser caracterizada como o processo em que ocorre quando a substância absorvida é embebida por uma substância adsorvente. E a sorção é quando ocorre uma nova distribuição de uma determinada substância de fase líquida para a sólida (MAES et al., 2014).

Conforme WANG *et al.* (2017), consórcios formados por bactérias e algas, ou algas sozinhas têm a capacidade de bioacumular fármacos provenientes de efluentes, ao invés de quebrá-los por meio de sorção, e o mesmo estudo também indica que a biomassa gerada por meio desse processo de tratamento precisa ser descartada a fim de impedir que haja liberação de fármacos sorvidos.

Em sistema de tratamento utilizando lodos ativados convencionais, um dos processos de remoção de fármacos é a volatilização, como já mencionado anteriormente, atuando em fármacos semivoláteis e voláteis em tratamento aberto de microalgas, porém esse processo não decompõe os micropoluentes, apenas realiza a transferência deles dos corpos hídricos para a atmosfera. No processo de biodegradação, as substâncias químicas orgânicas são decompostas por meio da ação de enzimas produzidas por microrganismos, nas tecnologias que utilizam algas, elas atuam como protagonistas no processo de biodegradação dos contaminantes orgânicos. (TORRES et al., 2008)

## 2.6 Encapsulamento de microalgas em alginato de sódio

É um processo em que consiste no aprisionamento ou imobilização das enzimas ou células em uma matriz polimérica de proteção por meio de interação físico-químicas. Esse processo geralmente é utilizado com objetivo de proteger as microalgas de condições ambientais adversas, tais como altas e baixas temperaturas, radiação ultravioleta ou limitação de nutrientes (CHEIRSILP et al., 2017; XIE et al., 2018). Cada vez mais tem sido utilizada a biomassa imobilizada para aplicação em tratamento de efluentes, uma vez que este método consegue aperfeiçoar características particulares dos organismos, como a retenção de sólidos, remoção de DBO, bem como exclui a etapa de sedimentação do processo. De uma maneira geral, o processo de imobilização consegue elevar a eficiência do sistema e diminuir custos relacionados aos processos biológicos de tratamento (CAO et al., 2020; KUBE et al., 2021; GIESE, 2015).

Este procedimento pode ser realizado por meio de inúmeras técnicas, dentre elas: imobilização celular – consiste no processo de incorporação de células de microalgas em um meio suporte que possibilitam um ambiente protetor, como: fibras e esponjas; microencapsulação – processo em que são utilizadas pequenas esferas ou cápsulas feitas de polímeros biodegradáveis que atuam na proteção das células das microalgas enquanto são efetuadas troca de nutrientes e gases; e grânulos de alginato – em que ocorre o encapsulamento das células de microalgas em um meio suporte semelhante a um gel feito de alginato de sódio e cloreto de cálcio, sendo uma das técnicas mais mencionadas em algumas literaturas referentes ao tema em questão (ANNUNZIATA et al., 2020).

O encapsulamento em uma matriz polimérica limita a mobilidade das células, mas uma vez que são liberadas permitindo que se mantenham vivas por um maior período. Após a absorção dos contaminantes pelas microalgas, as águas mais limpas difundem-se para fora dos polímeros, são coletadas e reutilizadas, e o processo é repetido por vários ciclos. Conseqüentemente, muitos polímeros podem atender a esse requisito. Os principais problemas ao usar qualquer um deles são (1) eficiência do sistema na remoção de poluentes; (2) custo do polímero; (3) custo do processo de imobilização. O método de imobilização apresenta algumas vantagens importantes (4) concentra biomassa elevada que pode ser usada como subproduto; (5) evita a filtração da água residual tratada, que pode ser usada como está; (6) tem alta resistência a compostos tóxicos na água residual tratada; (4) pode (DE-BASHAN E BASHAN, 2010).

Para realizar a escolha de uma matriz suporte para o processo de encapsulamento, deve ser levado em consideração propriedade básicas, como: resistência a degradação biológica e algumas reações químicas; não apresentar grau de toxicidade às células; possuir uma elevada habilidade de retenção celular, possibilita uma interação entre os produtos e substratos, além de ter uma flexibilidade relacionada às demandas mecânicas (pressão interna de gases, compressão e tensão de cisalhamento, por exemplo). Os materiais utilizados podem ser polímeros sintéticos – poliacrilamida, poliestireno e poliuretano); polímeros naturais – quitosana, alginato e celulose; e materiais inorgânicos (alumina, zircônia e sílica) (SCHMIDELL et al., 2001).

Para esse método, foi bastante relatado a utilização de polímeros naturais, como a quitosana, alginato de sódio e carragenina. Neste estudo, o alginato de sódio foi escolhido como matriz polimérica, considerando que é recorrentemente utilizado para essa finalidade, considerando sua competência em gerar grânulos de gel quando exposto à cátions bivalentes, como o  $\text{Ca}^{2+}$  (VOO et al., 2011).

O alginato é um biopolímero oriundo da parede celular das algas marrons, geralmente é utilizado e comercializado como alginato de sódio e de cálcio. Possui uma propriedade de estruturar formas coloidais e está sendo cada vez mais utilizado não só no meio acadêmico de tecnologias relacionadas à tratamento de efluentes, por exemplo, mas também na área alimentar e de saúde, sendo utilizado em desenvolvimento de esferas farmacêuticas. No que se refere ao desenvolvimento de metodologias de tratamento, ele é capaz de formar uma matriz não tóxica e biodegradável, possibilitando a ampliação de gases e nutrientes na matriz, gerando viabilidade aos organismos ali presentes (DOS SANTOS SILVA, 2011; VIJAYALAKSHMI et al., 2016). Este procedimento pode ser realizado por meio de inúmeras técnicas, dentre elas: imobilização celular – consiste no processo de incorporação de células de microalgas em um meio suporte que possibilitam um ambiente protetor, como: fibras e esponjas; microencapsulação – processo em que são utilizadas pequenas esferas ou cápsulas feitas de polímeros biodegradáveis que atuam na proteção das células das microalgas enquanto são efetuadas troca de nutrientes e gases; e grânulos de alginato – em que ocorre o encapsulamento das células de microalgas em um meio suporte semelhante a um gel feita de alginato de sódio e cloreto de cálcio, sendo uma das técnicas mais mencionadas em algumas literaturas referentes ao tema em questão (COVIZZI et al., 2007).

Essa técnica tem um potencial de aplicabilidade bastante vasto, tais como: o encapsulamento de microalgas para serem utilizadas na produção de biocombustíveis, componentes alimentícios e alimentos utilizados para suprimento de minerais e vitaminas e produtos farmacêuticos, além disso, também pode ser aplicado na preservação de culturas de microalgas, devido a possibilidade de armazenamento destas sem cultivo contínuo por um longo prazo. Ademais, também é bastante eficaz no que tange ao tratamento de efluentes, considerando que as microalgas têm uma capacidade de absorver metais e nutrientes, bem como produzir biomassa e oxigênio, pode-se também acrescentar que esta técnica gera o aumento da eficiência do processo e possibilita que o material que foi encapsulado possa ser recuperado após o tratamento.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e efluentes (LABIFI), situado no campus Maracanã da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

#### 3.1 Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*

Para o cultivo da microalga *C. vulgaris*, esta foi mantida em uma incubadora com condições controladas (Figura 7), sendo o pré-cultivo (inóculo) iniciado três a cinco dias antes da realização do ensaio, mantidas no meio L.C. Oligo sendo preparado no laboratório de acordo com as recomendações da ABNT NBR n° 12.648/2011. Antes da realização do ensaio, foi realizada a contagem para obter a biomassa inicial da microalga de  $10^6$  algas mL<sup>-1</sup>.

Figura 7: Incubadora para cultivos de microalgas em condições ambientais controladas.



Fonte: A autora, 2022.

#### 3.2 Produção de microesferas – encapsulamento

A primeira etapa do trabalho foi referente a busca de protocolos e a produção das microesferas a serem utilizadas para o encapsulamento das microalgas em alginato de sódio.

Para o encapsulamento, 5 mL da microalga *C. vulgaris* numa densidade aproximada de  $10^6$  mL<sup>-1</sup> e 0,2 g de alginato de sódio foram misturados e mantidos em agitação por 1 hora.

Para a precipitação das cápsulas foi preparada uma solução de 100 mL de água Mili-Q e 1,11 g de cloreto de cálcio em um béquer. Com o auxílio de uma bomba peristáltica deu-se início ao desenvolvimento das cápsulas. A solução de alginato e alga foi gotejada na solução de cloreto de cálcio numa vazão de 3 mL/min (Figura 8). As cápsulas formadas ficaram nesta solução por 1 hora, dentro do fluxo laminar e após esse período efetuada a lavagem das cápsulas com água Mili-Q em uma peneira de inox.

Figura 8: Etapa de formação das microesferas de alginato de sódio e microalgas e microesferas de alginato e água (controle) com a utilização da bomba peristáltica.



Fonte: A autora, 2022.

Na etapa 1 foram realizados dois experimentos distintos. Em ambos os experimentos a contagem de células de *C. vulgaris* foi realizada com amostras do meio líquido e após o encapsulamento em alginato de sódio, com objetivo de avaliar a sobrevivência dessas microalgas dentro das cápsulas e a liberação gradual destas no meio líquido. Nesta etapa, também foi feita a visualização, em microscópio, do interior da cápsula de alginato de sódio com *C. vulgaris*, a fim de verificar a integridade das células após o encapsulamento (Figura 9 e 10).

No primeiro experimento, aproximadamente 1,8 g de cápsulas foram distribuídas em um erlenmeyer, sendo adicionado 50 ml de água Mili-Q. Os erlenmeyers foram colocados em uma mesa agitadora orbital com velocidade de 130 rpm. A liberação das algas encapsuladas no meio líquido, foi monitorada semanalmente durante 13 semanas por meio de contagem direta das células, com a utilização de uma câmera de Neubauer. O experimento foi realizado em duplicata (n=2).

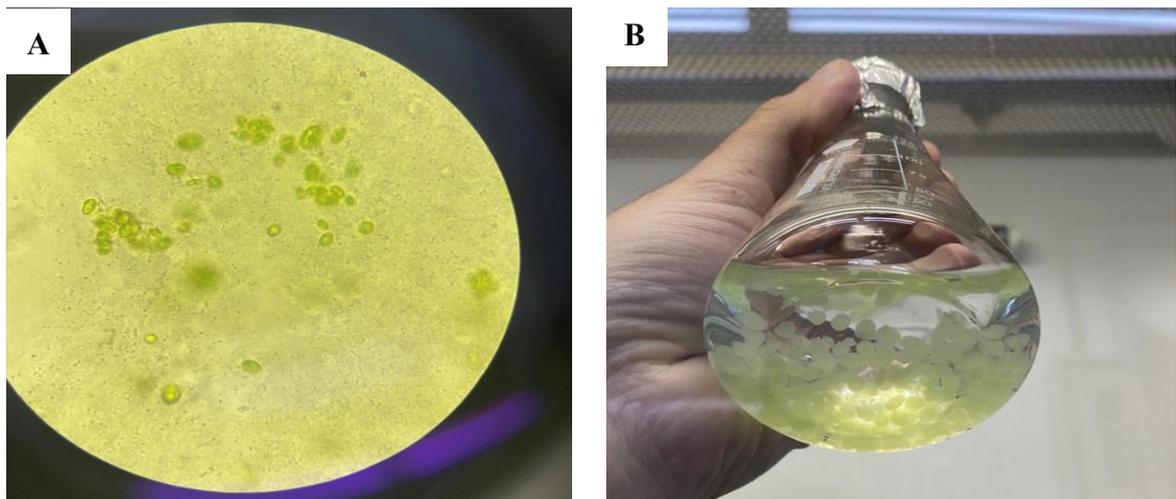
O segundo experimento foi realizado utilizando um volume maior de cápsulas. Desta forma, foram obtidas um total de 37,83 g de cápsulas, sendo estas divididas em dois erlenmeyers contendo 50 mL de água destiladas em cada um deles, sendo mantidos nas condições anteriormente descritas.

Figura 9: Ensaio de viabilidade do encapsulamento das microalgas em alginato de sódio.



Fonte: A autora, 2022.

Figuras 10 A e B: Microalga *C. vulgaris* encapsulada em alginato de sódio – microscópio óptico e visão das cápsulas em meio aquoso.

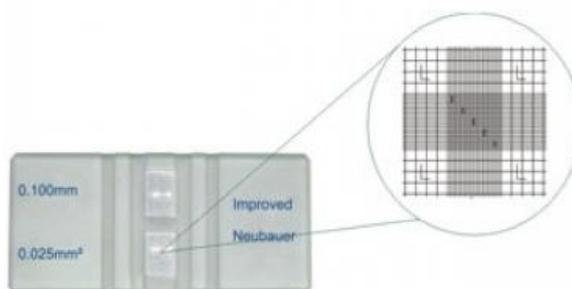


Fonte: A autora, 2022.

A contagem das microalgas foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico, marca Nikon em 400x de magnificação em câmara de Neubauer. As contagens foram sempre realizadas utilizando os quadrantes “E” da câmara (Figura 12) e multiplicados pelo fator de

correção para a estimativa da densidade de algas mL<sup>-1</sup>. Os resultados das contagens foram analisados no Excel, utilizando a ferramenta de análise de dados ANOVA, fator duplo com repetição.

Figura 11: Representação da câmara de Neubauer utilizada para a contagem das células de *Chlorella vulgaris*.



Fonte: [www.casalab.com.br](http://www.casalab.com.br)

### 3.3 Ensaios de remoção/degradação do hormônio EE2

Na segunda etapa do trabalho foram realizados os bioensaios com as microalgas encapsuladas em alginato de sódio, com objetivo de avaliar a eficiência da ação das microalgas encapsuladas na remoção do hormônio de EE2 do meio aquoso.

O experimento teve início com a contagem das células de algas para o ajuste da biomassa inicial equivalente a 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>. Em seguida foi centrifugado 1 litro de microalgas em tubos Falcon de 50 ml a 20°C, por 15 min em uma velocidade de 1180 rpm, resultando em um volume final de 200 ml de algas. Após isso, foi realizada uma nova contagem da biomassa da microalga, para verificação da densidade (10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>). Foi adicionado aos 200 ml um volume de 250 ml de meio L.C. Oligo e o volume final da solução contendo as algas e o meio de cultivo foi de 450 ml.

O meio de água mineral com hormônio foi preparado utilizando 1 litro de água mineral e 48 µl da solução estoque de EE2 do laboratório para obtenção da concentração inicial de 50 µg de EE2/L. O meio de água mineral contendo o hormônio foi armazenado em condições ideais, principalmente, isolado da exposição de luz em uma cabine de fluxo laminar esterilizada.

A solução de 450 ml de algas foi dividida em dois volumes iguais de 225 ml de algas livres para o bioensaio e 225 ml das algas para a realização do encapsulamento em microesferas de alginato de sódio. Em seguida, em um béquer de 600 mL foi adicionado 225 ml de algas e 4,5 g de alginato de sódio e em outro béquer foi adicionado o mesmo volume de água mineral (sem algas) e 4,5 g de alginato de sódio, ambos os béqueres ficaram agitando por 1 hora no agitador magnético e uma barra magnética. Após esta etapa, foram preparadas em dois béqueres diferentes a mesma solução composta por 250 ml de água Mili-Q mais 2,77g de cloreto de cálcio, em seguida, foram feitas as microesferas com a utilização da bomba peristáltica. Sendo então preparadas as esferas com e sem a presença das microalgas.

As microesferas permaneceram em solução por 1 hora e em seguida, foram lavadas com água destilada com o auxílio de uma peneira de inox. Estas então foram pesadas e apresentaram os seguintes pesos: 164,24g de microesferas de alginato e água mineral; e 161,20g de microesferas feitas com alginato de sódio e microalgas. O experimento foi realizado em triplicatas, em Erlenmeyer com capacidade de 225 ml, totalizando 12 amostras, com as seguintes combinações, ressaltando que estas foram realizadas em triplicatas (Figura 12):

1. Água mineral e hormônio EE2
2. Microalga *C. vulgaris* e hormônio EE2;
3. Água mineral, cápsulas feitas de alginato de sódio com água, e hormônio EE2;
4. Água mineral, cápsulas feitas de microalga *C. vulgaris* e alginato de sódio, e hormônio EE2.

Figura 12: Ensaios das amostras, em triplicata (n=3), contendo somente água mineral e hormônio EE2 (amostras B), *C. vulgaris* e EE2 (amostras A), água mineral, cápsulas de alginato de sódio e EE2 (amostras C), e água mineral, *C. vulgaris* encapsulada em alginato de sódio e EE2 (amostras D).



Fonte: A autora, 2022.

Nos períodos determinados (T0, T6, T24 e T96 horas) foram coletados 6 ml dos meios líquidos de cada amostra. Para contagem de células, 1 ml foi transferido para um tubo de 1,5

ml acrescido de lugol. A contagem das microalgas foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico, marca Nikon em 400x de magnificação em câmara de Neubauer.

Para a análise cromatográfica, 5 ml das amostras foram transferidos para um tubo Falcon de 15 ml. Os tubos foram então centrifugados por 15 min, 2.000 rpm a 20°C. Após a centrifugação, foram coletados cerca de 2 ml de cada uma das amostras e filtrado em filtros seringa de 0,20 µm IC Millex – LG para análise cromatográfica em fase líquida (UPLC).

As análises cromatográficas foram realizadas no LABIFI, de acordo com o método desenvolvido por Coutinho (2020) por cromatografia líquida de Ultra performance UPLC (Xevo TQS com analisadores de massa em tandem do tipo quadrupolo da Waters) (Figura 13).

Figura 13: Cromatógrafo em fase líquida de Ultra performance (UPLC, Waters ACQUITY®) localizado no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e efluentes (LABIFI).



Fonte: A autora, 2022.

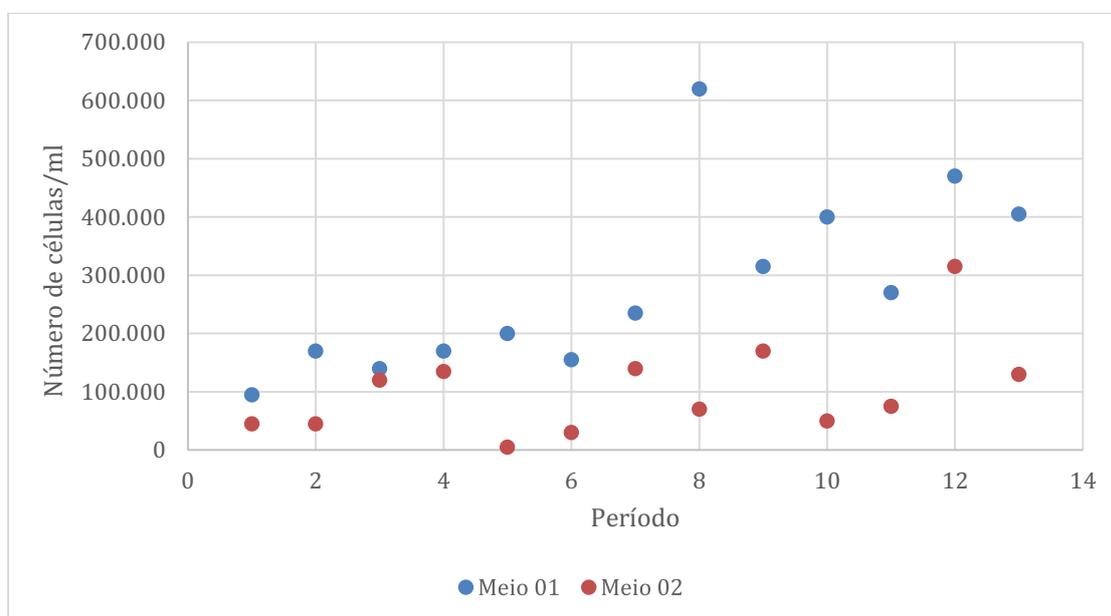
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da produção de biomassa algal ao longo do tempo

Nos meios 1 e 2, sendo estes meios líquidos contendo a microalga *C. vulgaris* encapsulada em alginato de sódio, foram observadas tendências de crescimento do número de células/ml de microalga ao longo do tempo, sendo verificado um crescimento máximo de 553% do meio 01 na 8ª semana de observação e com um crescimento de 326% ao fim de 13 semanas (Gráfico 1, cor azul). Já no meio 2 (Gráfico 1, na cor vermelha) foi possível verificar um crescimento máximo de 188% ao fim das 13 semanas.

Com base nos dados de densidade celular ( $\text{mL}^{-1}$ ) ao longo do tempo, foi possível verificar que, embora tenham ocorrido oscilações de valores nas densidades celulares de *C. vulgaris* liberadas no meio líquido (Gráfico 1), após o seu encapsulamento em alginato de sódio, duas curvas (cor azul e vermelha) tenderam a um aumento no número de células. Sendo assim, pode-se inferir que estas conseguem se manter vivas e se multiplicar (reproduzir), mesmo após o seu encapsulamento.

Gráfico 1: Representação do número de células de  $\text{mL}^{-1}$  ao longo do tempo, nos meios 01 e 02.



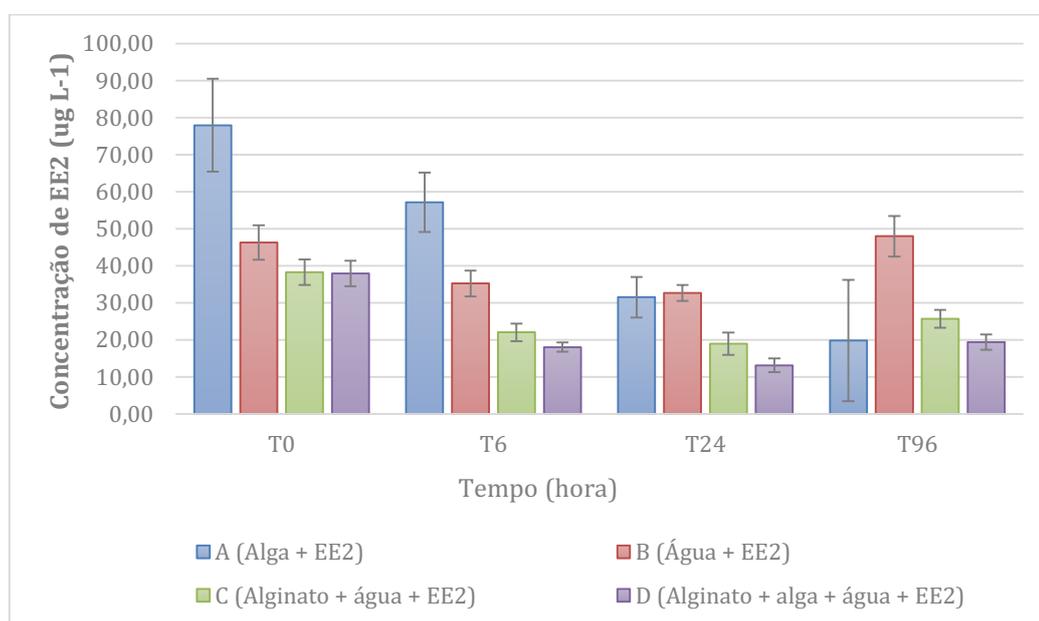
Fonte: A autora, 2022.

## 4.2 Degradação das concentrações de EE2

Após os resultados extraídos da cromatografia, foi verificado que, nas primeiras 6 horas de experimento, a amostra A (alga + EE2) teve uma redução da concentração inicial de EE2 de 26,7%. A amostra B contendo apenas água e EE2 (controle) reduziu 23,9%, a amostra C proveniente do Erlenmeyer contendo água, microesferas de alginato de sódio e EE2 reduziu 42,5% e a amostra D referente ao meio com água, microesferas de alginato de sódio com alga e EE2 reduziu 52,47%. No entanto, após 96h a melhor resposta foi verificada na amostra A (alga + EE2) com 75% de redução da concentração inicial de EE2, seguida pela amostra D (alginato + alga + EE2) com 49%. Tais resultados sugerem uma grande contribuição das algas no processo de biorremediação do EE2.

O gráfico 2 apresenta as respectivas reduções das concentrações das amostras ao longo do ensaio, com os desvios-padrões.

Gráfico 2: Análise do processo de degradação do hormônio EE2 ao longo do período de 96 horas.



Fonte: A autora, 2022.

A Tabela 1 apresenta as porcentagens de redução das concentrações iniciais do hormônio EE2 ao longo das 96 h de experimento. Observou-se que nas primeiras 6 horas de ensaios, todas as amostras apresentaram uma redução da concentração de EE2 acima de 20%.

A degradação do hormônio EE2 nos controles, ou seja, sem a presença das microalgas foi atribuída principalmente ao processo de fotodegradação, visto que os frascos ficaram expostos a luz.

Por outro lado, a presença de microalgas nos bioensaios e a conseqüente redução da concentração do EE2 foi atribuída aos processos de fitorremediação e adsorção. Tais processos de adsorção e fitorremediação foram também verificados na redução da concentração do EE2 por LAI et al., 2002.

Tabela 1: Redução percentual da concentração inicial de EE2 ao longo do tempo.

<b>Redução da concentração de EE2 ao longo do tempo</b>			
	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>96 horas</b>
<b>A</b>	27%	60%	75%
<b>B</b>	24%	29%	-4%
<b>C</b>	42%	51%	33%
<b>D</b>	52%	65%	49%

Legenda: A (alga + EE2); B (água mineral + EE2); C (cápsulas de alginato + água mineral + EE2) e D (cápsulas de alginato + algas + EE2 + água mineral).

A partir dos dados da tabela 1 foi possível verificar que a amostra contendo a microalga encapsulada em alginato de sódio apresentou um grande potencial de redução em pouco tempo de ensaio (24 horas) equivalente a 65% de redução de EE2, sendo o maior decréscimo percentual dentro do intervalo de tempo analisado. Todavia, após 24 horas de ensaio foi possível também verificar que em todas as amostras houve uma redução da concentração de EE2, entretanto, após as 96 horas de experimento, apenas a amostra A contendo apenas *C. vulgaris* livre manteve uma redução da concentração de EE2 equivalente a 75% em relação ao T0.

Com os resultados obtidos nas amostras C e D, pode-se inferir que as cápsulas de alginato apresentaram uma capacidade de sorção do EE2. No entanto, após 24h houve uma liberação novamente deste hormônio para o meio aquoso. Além disso, foi possível verificar que a amostra contendo algas livres apresentou uma maior eficiência ou melhor desempenho na redução da concentração do hormônio EE2 (amostra A). Em alguns estudos da literatura, já foi relatado que as microalgas possuem capacidade de realizar a remoção de matéria orgânica, bem como nutrientes de efluentes domésticos, porém ao se tratar de remoção de desreguladores endócrinos ainda não há tantos estudos neste sentido. Os poucos estudos que abordam sobre a capacidade da remoção destes micropoluentes por microalgas, em escala de laboratório, indicam que o processo de remoção pode ocorrer por fotodegradação, biodegradação,

evaporação e/ou adsorção de microalgas (GE et al., 2009; ABARGUES et al., 2013; JI et al., 2014; MATAMOROS et al., 2016B).

Segundo Lai et al. (2002) a remoção de estrogênios como, estradiol, estrona, estriol, hidroxiestrona, valerato de estradiol e etinilestradiol, com a concentração inicial de 500 ng/l, e utilizando a *C. vulgaris* em duas condições diferentes (claro e escuro), foi evidenciado que 50% do estradiol foi degradado em condições intermediárias não identificadas, uma pequena parcela foi transformada em estrona sob condições ambientais com luz e no escuro houve uma degradação no estradiol a estrona. Com base nisto, verificou-se que também a capacidade de transformação de estrogênio em outros estrogênios quando expostos à *C. vulgaris*.

As tabelas 2 e 3, apresentam um comparativo entre os valores de concentração e percentual da degradação do EE2 e do controle em cenários utilizando a microalga livre e encapsulada em alginato de sódio.

Tabela 2: Comparativo entre a degradação do EE2 na presença da microalga *Chlorella vulgaris* livre e a degradação do hormônio na sua ausência.

	T0	T6	T24	T96
<b>Microalga livre</b>	77,96 ug L-1	57,15 ug L-1	31,52 ug L-1	19,80 ug L-1
<b>Percentual</b>	0%	27%	60%	75%
<b>Controle</b>	46,29 ug L-1	35,22ug L-1	32,68 ug L-1	47,98 ug L-1
<b>Percentual</b>	0%	24%	29%	-4%

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 3: Comparativo entre a redução da concentração de EE2 por meio da ação da *Chlorella vulgaris* encapsulada em alginato de sódio, e o controle da degradação.

	T0	T6	T24	T96
<b>Microalgas encapsuladas em alginato de sódio</b>	37,93 ug L-1	18,03 ug L-1	13,11 ug L-1	19,4 ug L-1
<b>Percentual</b>		52%	65%	49%
<b>Cápsulas de alginato de sódio (controle)</b>	38,28 ug L-1	22,02 ug L-1	18,94 ug L-1	25,67 ug L-1
<b>Percentual</b>		42%	51%	33%

Fonte: A autora, 2022.

Em um estudo realizado por Sole e Matamoros (2016) foi avaliada a remoção de nutrientes e de seis desreguladores endócrinos: bisfenol A (BPA), EE2, 4-octilfenol (4-OP), bisfenol AF (BPAF), bisfenol F (BPF) e 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) em esgoto doméstico em reatores de bancada por microalgas imobilizadas em capsulas de alginato. Dos seis compostos avaliados, observou-se que três deles foram afetados pela presença de microalgas, sendo eles:

BPA, EE2 e 4-OP). Também foi observado que a imobilização de microalgas influenciou de maneira significativa na remoção de BPF, 2,4-DCP e BPAF, no caso do BPAF, a remoção foi de 60% após seis dias de experimento nos reatores contendo capsulas de microalgas, já no caso do 2,4-DCP, houve uma eficiência de remoção deste 76% para reatores com esferas de alginato, tendo uma remoção de 67% para os reatores controles destas esferas. Tratando-se do BPF, a sua remoção foi bastante eficiente nos reatores com esferas de alginato, tendo um valor de 69% de remoção. Cabe mencionar que ainda no estudo citado anteriormente, a co-imobilização das microalgas foi avaliada a fim de verificar se este processo iria melhorar a eficiência na remoção dos desreguladores endócrinos, como os que foram mencionados acima. Foi observado que no caso do BPAF, houve uma redução da concentração nos reatores com microalgas até o 3º dia de experimento, mas também houve um incremento da concentração após esse período, retornando ao nível inicial, depois de seis dias de incubação.

Esta mudança no declínio da concentração nos reatores com microalgas livres, pode ser explicada pelo aumento do pH, que atingiu o valor de 11, enquanto o pH dos reatores com grânulos de alginato permaneceu entre 8 e 9 durante todo o período experimental de incubação. Tais fatos podem ser explicado quando se observa as propriedades físico-químicas do BPAF, sendo este um composto hidrofóbico ( $\log K_{ow} > 4$ ) com um  $pK_a$  de 9,2, e a mudança no pH de 8,8 para 11 entre o terceiro e o sexto dia pode ter gerado a sua ionização e, conseqüentemente, sua liberação da biomassa para a fase aquosa. Tal cenário coincidiu com a redução da quantidade de BPAF que ficou aderido à microalga, reduzindo de 16% (3º dia) para 3% (6º dia) (SOLE e MATAMOROS, 2016).

Segundo Zhang et al. (2014), após um experimento em bancada, com a utilização da microalga *Scenedesmus dimorphus*, foi alcançada uma redução de até 85% para o  $17\alpha$ -estradiol e estrona, e 95% para o  $17\beta$ -estradiol e estriol em um período de 8 dias. Também foi identificado por meio deste estudo que os principais meios de remoção destas substâncias são os processos de fotodegradação, biotransformação e sorção, e que de uma maneira geral, os mecanismos que atuaram na reação envolveram redução, oxidação e hidroxilação durante o processo de remoção dos compostos. A degradação ocorreu pela transformação dos compostos  $17\alpha$ -estradiol e  $17\beta$ -estradiol em estrona e em seguida, foram convertidos em estriol ou interconvertido em  $17\alpha$ -estradiol e/ou  $17\beta$ -estradiol, sendo essas transformações também já identificadas em outros estudos, como LAI et al., 2002.

Em um outro estudo realizado por Hom-Diaz et al. (2015), após um dia de incubação, houve uma redução de 30% da concentração de EE2 na presença de microalgas, bem como uma baixa degradação na amostra controle. Este mesmo estudo também mencionou que a

suplementação com lodo proveniente de digestão anaeróbia no meio de cultivo da microalga *Selenastrum capricornutum* influenciou no aumento da degradação do EE2 de 60% para 95%.

GAO et al. (2011) avaliaram em seu estudo, a eficiência da remoção de Nonilfenol (NP) por meio da ação da *C. vulgaris* livre e encapsulada em alginato de sódio, em que foi verificado que a microalga livre teve eficiência de redução menor do que as encapsuladas, nos tempos 12 e 24 horas. A microalga livre removeu 59% no tempo 12 horas, já as microalgas encapsuladas reduziram 73% e o controle do encapsulamento, 76%. Esse estudo ainda demonstrou que a *C. vulgaris* encapsulada em alginato performou bem no que toca a remoção do NP, uma vez que este foi adsorvido de forma rápida a matriz polimérica (alginato), depois foi adsorvido ou absorvido pelas células de microalgas para posterior degradação. Este artigo ainda também associou a alta eficiência de remoção de Bisfenol F, uma redução de 80% após 10 dias de incubação, ao elevado potencial de adsorção do encapsulamento em alginato.

#### 4.3 Relação entre a concentração de EE2 e a densidade algal

A densidade algal inicial foi de  $10^6$  mL<sup>-1</sup> para todos bioensaios que envolviam a presença de algas, confirmado por meio da contagem de células em câmara de Neubauer. Sendo assim, foi avaliada a relação entre a redução da concentração de EE2 e a densidade de *C. vulgaris* em dois cenários diferentes, sendo ela livre ou encapsulada em alginato de sódio.

Ao realizar a avaliação do comportamento da *C. vulgaris* livre, verificou-se que com o decorrer do tempo de ensaio, conforme houve uma redução da concentração de EE2, reduziu-se a densidade de alga (Gráfico 3 e Tabela 4). Como hipótese do ocorrido, pode-se dizer que a concentração de EE2 teve um efeito inibidor no crescimento da microalga, mesmo promovendo a sua degradação. Uma outra hipótese é que a microalga poderia estar utilizando o EE2 como fonte de carbono e sua redução resultou numa menor fonte de carbono para reprodução.

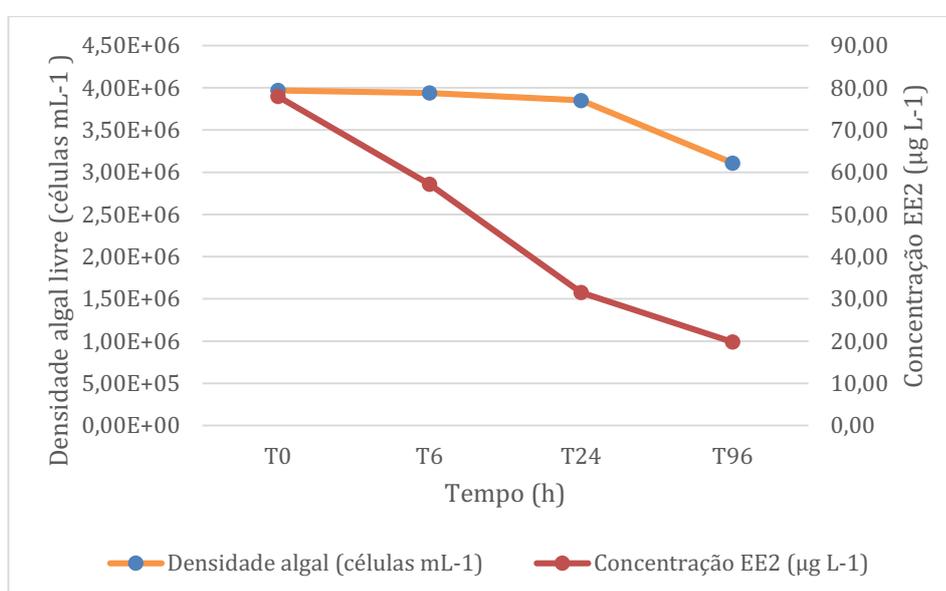
Após a realização das contagens de células (Tabela 4), foi realizada a análise estatística ANOVA fator duplo com repetição, por meio do Excel para determinar se houve diferenças significativas entre as amostras contendo microalgas livres (Gráfico 3 e Tabela 4) e microalgas encapsuladas em alginato (Gráfico 4 e Tabela 5), ambas na presença do EE2, sendo utilizado nível de significância de 0,05. Após a análise de dados, verificou-se que as diferenças entre a densidade algal e a concentração foram estatisticamente diferentes.

Tabela 4: Valores médios de concentração de EE2 (ug L-1) e densidade algal de *Chlorella vulgaris* (células mL-1).

	T0	T6	T24	T96
<b>Densidade algal (células mL-1)</b>	$3,97 \times 10^6$	$3,94 \times 10^6$	$3,85 \times 10^6$	$3,11 \times 10^6$
<b>Concentração EE2 (ug L-1)</b>	77,96	57,15	31,52	19,80

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 3: Relação entre a densidade da microalga livre, *C. vulgaris* com a redução da concentração de 17-alfa etinilestradiol (EE2) ao longo do tempo de experimento.



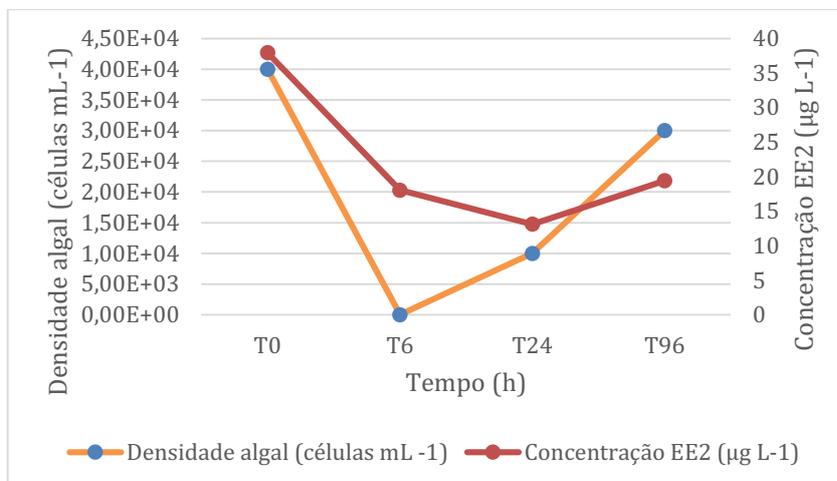
Fonte: A autora, 2022.

Tabela 5: Decaimento da densidade da microalga encapsulada em alginato de sódio, *Chlorella vulgaris* e a redução da concentração de EE2 ao longo das 96 h de experimento.

	T0	T6	T24	T96
<b>Densidade algal (células mL-1)</b>	$4,0 \times 10^6$	0,0	$1,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
<b>Concentração EE2 (ug L-1)</b>	37,93	18,03	13,11	19,4

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 4: Representação gráfica da relação entre a densidade algal de *C. vulgaris* encapsulada e a redução da concentração de 17-alfa etinilestradiol (EE2) ao longo do tempo de ensaio.



Fonte: A autora, 2022.

LAU e colaboradores (1997) avaliaram a eficiência da remoção de nutrientes em amostras de efluentes por *C. vulgaris* imobilizada no polímero carragenina, obtendo eficiências de remoção de nitrogênio e fósforo na ordem de 95% e 100%, respectivamente. Também foram avaliadas as eficiências da *C. vulgaris* imobilizada em carragenina e alginato aplicado no tratamento de efluentes domésticos, sendo verificado que embora as células de algas tenham crescido de forma mais lenta do que em suspensão, elas foram metabolicamente mais ativas. O mesmo estudo também avaliou que em apenas 3 dias, mais de 95% de amônio e 99% dos fosfatos foram removidos do esgoto, sendo mais eficiente a remoção com as microalgas encapsuladas do que livres, que removeram 50% de nitrogênio e de fósforo no mesmo intervalo de tempo.

Segundo Mulla et al. (2013), a imobilização pode ser utilizada com objetivo de proteger células bacterianas de compostos inibidores ou tóxicos. Fernández et al. (2017) identificaram que os estrogênios em baixas concentrações não são tóxicos para as bactérias degradadoras destes compostos, neste caso a técnica de encapsulamento foi utilizada com intuito de manter as bactérias no sistema. Ainda nesse estudo, foi avaliado que a eficiência de remoção dos compostos foi reduzida em condições de imobilização, considerando a limitação de nutrientes nos compostos da matriz polimérica, bem como a quantidade menor de bactérias que conseguem sobreviver após a imobilização, sendo necessário possibilitar condições de sobrevivência das células bacterianas e o processo de transferência de poluentes e nutrientes em condições de encapsulamento.

Considerando os dados do gráfico 3 e 4 e as tabelas 4 e 5 foi verificado que a medida em que houve uma redução da concentração de EE2 ao longo do tempo de ensaio, houve uma redução da densidade algal de *C. vulgaris*, tanto nos cenários dela livre quanto ela encapsulada em alginato de sódio. Dessa forma, embora alguns estudos já tenham correlacionado o aumento da densidade de algas conforme há uma redução na concentração de EE2, foi verificado que, outros estudos abordam alguns fatores que podem inibir o crescimento das microalgas, como por exemplo, segundo Dubinsky et al. (1986), quando uma luz atravessa um meio e alcança uma célula de microalga, a quantidade de luz disponível para a fotossíntese é determinada pela eficiência de absorção da célula e pelo espectro da luz incidente, que depende do comprimento de onda. A energia eletromagnética da luz absorvida é transformada em energia bioquímica por meio da fotossíntese, e é utilizada para processos metabólicos, crescimento e respiração celular (MASOJIDEK et al., 2013).

Deste modo, a luz é frequentemente um fator limitante para o crescimento de microalgas. Se a intensidade da luz for muito baixa (ou não suficiente), a respiração celular consome compostos de alto carbono em uma taxa mais alta do que a produzida na fotossíntese, e nenhuma nova biomassa é acumulada. Por outro lado, se a intensidade da luz for extremamente alta, o processo de fotoinibição no fotossistema II produz radicais livres que podem causar danos foto-oxidativos e, em casos graves, levar à morte celular. Além da luz, existem fatores abióticos que podem afetar o crescimento de microalgas, como nutrientes, salinidade, produtos químicos, concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, pH e temperatura (MATA et al., 2010).

## 5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo apontam que as amostras com algas livres tiveram um melhor desempenho no resultado no que tange a remoção de EE2 ao longo do tempo. Tal afirmação considerou as reduções de concentração nos tempos 6 horas, 24 horas e 96 horas finais, tendo uma porcentagem de redução final de 75%. As algas encapsuladas em alginato de sódio tiveram uma eficiência de 49% de remoção de EE2 após as 96 horas de experimento e a amostra contendo água.

Verificou-se também que as algas em cápsulas de alginato representam um maior tempo de manutenção dessas células no ambiente. Elas atuam como um estoque ou fonte de microalgas, que pela sua viabilidade, podem seguir o processo de divisão celular e manter a concentração de algas elevadas, com uma tendência exponencial de crescimento, garantindo a eficiência de remoção de micropoluentes ambientais em tanques de tratamento terciário por um período maior.

Sendo assim, pode-se dizer que metodologia de encapsulamento de microalgas avaliada foi viável para a remoção do hormônio EE2, gerando um aumento na eficiência do processo. Entretanto, aprimoramentos no que tange ao controle das condições ambientais durante a exposição dos micropoluentes a estas microalgas encapsuladas devem estudadas, uma vez que o fornecimento de nutrientes para as microalgas durante o processo de tratamento pode colaborar para o aumento do processo de degradação dos poluentes e conseqüentemente, um aumento da eficiência do tratamento.

Por fim, considerando ainda que existem poucos estudos relacionados ao encapsulamento de microalgas para serem utilizadas no tratamento de efluentes, visando a remoção de micropoluentes, este estudo contribuiu para a elucidação de alguns fatores relacionados a este tema. No entanto, mais estudos e pesquisas relacionados a esta tipologia de tratamento objetivando maior rendimento do sistema de tratamento são importantes e necessários para uma melhor compreensão das potencialidades da aplicação da metodologia da imobilização de microrganismos aplicado ao tratamento de efluentes, especialmente com foco nos compostos com efeitos desreguladores do sistema endócrino.

## REFERÊNCIAS

- ANNUNZIATA, G. et al. Microencapsulation as a tool to counteract the typical low bioavailability of polyphenols in the management of diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 139, p. 111248, 2020.
- AQUINO, Sérgio Francisco de; BRANDT, Emanuel Manfred Freire; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013.
- ARAUJO, Juliana Coutinho de. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- AVILA, C. et al. 2014. Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater. **Science of the total environment**, v. 470, p. 1272-1280, 2014.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2º ed – Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BASHAN, Y. et al. Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran Desert. **Applied Soil Ecology**, v. 14, n. 2, p. 165-175, 2000.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, Gina. Azospirillum–plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; GONZÁLEZ, L. E. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 1999.
- BILA, D M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BKR AMBIENTAL. 2019. Saneamento básico e meio ambiente: quais os impactos no dia a dia das cidades? **Saneamento em pauta por BKR Ambiental**. Disponível em: <https://blog.brkambiental.com.br/saneamento-basico-e-meio-ambiente/>.2019.

BOLONG, N. et al. 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.

CHANDRA, K. et al. Sustained high temperature increases the vitellogenin response to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Aquatic Toxicology**, v. 118, p. 130-140, 2012.

CHANG, H.; WAN, Y.; HU, J. Determination and source apportionment of five classes of steroid hormones in urban rivers. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 20, p. 7691-7698, 2009.

CHAUTON, M.S. et al. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. **Aquaculture**, v. 436, p. 95-103, 2015.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

CRAGGS, R.; SUTHERLAND, D.; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of high-rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 329-337, 2012.

CUNHA, D. L. et al. Regulamentação do estrogênio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol em matrizes aquáticas na Europa, Estados Unidos e Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, 2016.

CZARNY, K. et al. The impact of estrogens on aquatic organisms and methods for their determination. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 11, p. 909-963, 2017.

CZARNY, K. et al. Toxic effects of single animal hormones and their mixtures on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus armatus*. **Chemosphere**, v. 224, p. 93-102, 2019.

DE LA NOÛE, J.; LALIBERTÉ, G.; PROULX, D. Algae and waste water. **Journal of applied phycology**, v. 4, p. 247-254, 1992.

DE PAUW, N.; VAN VAERENBERGH, E. Microalgal wastewater treatment systems: potentials and limits. **Phytodepuration and the Employment of the Biomass Produced. Centro Ric. Produz, Animali, Reggio Emilia, Italy**, p. 211-287, 1983.

SALOMÃO, A.L.S.; MARQUES, M. Estrogenicity and genotoxicity detection in different contaminated waters. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 21, n. 7, p. 1793-1809, 2015.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 1611-1627, 2010.

DOS SANTOS SILVA, M. et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of hazardous materials**, v. 190, n. 1-3, p. 366-374, 2011.

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

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122-159, 2006.

FERNÁNDEZ, L. et al. Biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol by bacteria isolated from deep sea sediments in aerobic and anaerobic media. **Journal of hazardous materials**, v. 323, p. 359-366, 2017.

FOLMAR, L. C. et al. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1-2, p. 77-88, 2000.

FRY, D. M.; Environ. **Health Perspect.**1995.

GARCÍA-PACHECO, R. et al. Transformation of end-of-life RO membranes into NF and UF membranes: Evaluation of membrane performance. **Journal of Membrane Science**, v. 495, p. 305-315, 2015.

GARCIA-SEGURA, S.; BRILLAS, E. Applied photoelectrocatalysis on the degradation of organic pollutants in wastewaters. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 31, p. 1-35, 2017.

GRANDCLÉMENT, C. et al. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: a review. **Water research**, v. 111, p. 297-317, 2017.

GROSSMAN, A. B. 2019. **Considerações gerais sobre as glândulas adrenais**. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br>.

GUIMARÃES, J. R.; NOUR, E. A. A. 2001. **Tratamento de Esgotos**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, v. maio, n. Edição Especial, 2001.

HAMED, I. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 15, n. 6, p. 1104-1123, 2016.

HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H.; **Food Chem**. 1998.

HENRY, T. B.; BLACK, M. C. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 54, n. 2, p. 325-330, 2008.

HERNÁNDEZ-LEAL, L. et al. Removal of micropollutants from aerobically treated grey water via ozone and activated carbon. **Water research**, v. 45, n. 9, p. 2887-2896, 2011.

HOM-DIAZ, A. et al. Microalgae cultivation on wastewater digestate:  $\beta$ -estradiol and  $17\alpha$ -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. **Journal of environmental management**, v. 155, p. 106-113, 2015.

HUMBLE, J. L. et al. Characterisation of genes transcriptionally upregulated in the liver of sand goby (*Pomatoschistus minutus*) by  $17\alpha$ -ethinyloestradiol: Identification of distinct vitellogenin and zona radiata protein transcripts. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2722-2729, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Síntese de indicadores sociais, 2006. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006

INSTITUTO ONCOGUIA. 2016. **Hormônios Sintéticos X Menopausa**. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/hormonios-sinteticos-x-menopausa/8334/971/>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2021.

JORDÃO, E. P e PESSÔA, C. A. 1995. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995.

JØRGENSEN, S. E.; HALLING-SØRENSEN, Bent. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 691-699, 2000.

KIDD, K. A. et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 104, n. 21, p. 8897-8901, 2007.

LAU, P. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. **Environmental Technology**, v. 18, n. 9, p. 945-951, 1997.

LAGOS-CABRÉ, R.; MORENO, R. D. Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. **Biological research**, v. 45, n. 1, p. 5-14, 2012.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. **Science of the Total Environment**, v. 289, n. 1-3, p. 159-168, 2002.

LIANG, YQ et al. Transcriptional alterations induced by binary mixtures of ethinylestradiol and norgestrel during the early development of zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 195, p. 60-67, 2017.

LIU, J. et al. Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents. **Environmental pollution**, v. 162, p. 325-331, 2012.

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

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATAMOROS, V. et al. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: a pilot-scale study. **Journal of hazardous materials**, v. 288, p. 34-42, 2015.

MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, p. 845-850, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual do Saneamento. FUNASA. Brasília, 2015.

MUÑOZ, I. et al. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (northeast Spain). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2706-2714, 2009.

MULBRY, W. et al. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8137-8142, 2008.

MULLA, D J. Twenty five years of remote sensing in precision agriculture: Key advances and remaining knowledge gaps. **Biosystems engineering**, v. 114, n. 4, p. 358-371, 2013.

NASH, J. P. et al. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. **Environmental health perspectives**, v. 112, n. 17, p. 1725-1733, 2004.

NOUR, E. A. A. et al. Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, 2014.

PENG, F.Q. et al. Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): transformation kinetics and products identification. **Chemosphere**, v. 95, p. 581-588, 2014.

PENG, X. et al. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 889-898, 2014.

PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 385, n. 3, p. 422-424, 2006.

PHANG, S. Algal production from agro-industrial and agricultural wastes in Malaysia. **Ambio**, p. 415-418, 1990.

RAYMUNDO, A. et al. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 961-965, 2005.

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

RUNNALLS, T. J. et al. From single chemicals to mixtures—Reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 152-167, 2015.

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SAYRE, R. Microalgae: the potential for carbon capture. **Bioscience**, v. 60, n. 9, p. 722-727, 2010.

SCHLÜSENER, M. P.; BESTER, K. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilizing high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 22, p. 3269-3278, 2005.

SIMMONDS, N. J. et al. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 186-196, 1992.

SINGH, J.; DHAR, D. W. Overview of carbon capture technology: microalgal biorefinery concept and state-of-the-art. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p. 29, 2019.

SOLÉ, A.; MATAMOROS, V. Removal of endocrine disrupting compounds from wastewater by microalgae co-immobilized in alginate beads. **Chemosphere**, v. 164, p. 516-523, 2016.

SORATTO, J. et al. Estrategia de Salud de la Familia: una innovación tecnológica en salud. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 24, n. 2, p. 584-592, 2015.

SPOSITO, J. CV et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696-704, 2018.

SUÁREZ, S. et al. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, n. 2, p. 125-138, 2008.

SUKLA, L. B.; SUBUDHI, E.; PRADHAN, D. (Ed.). **The role of microalgae in wastewater treatment**. Springer Singapore, 2019.

TEDX (THE ENDOCRINE DISRUPTION EXCHANGE). 2018. **Entendendo a desregulação endócrina**. Disponível em: <https://endocrinedisruption.org/>.2018.

TEIXEIRA, É. O. Método de avaliação ambiental de espaços urbanos estudo de caso: Asa Sul do Plano Piloto de Brasília-DF. 2013.

TERNES, T.A., KRECKEL, P., MUELLER, J. “Behavior and occurrence of estrogens in municipal treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge”, **The Science of the Total Environment**. v. 225, pp. 91 – 99. 1999b.

THOMANN, R. V.; MUELLER, J. A. 1987. **Principles of surface water quality modeling and control**. New York: Harper & Row, 1987.

TORRES, J. L. R.; PEREIRA, M. G.; FABIAN, A. J. Produção de fitomassa por plantas de cobertura e mineralização de seus resíduos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 421-428, 2008.

URBATZKA, R. et al. Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 164, p. 28-35, 2012.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Wastewater Management Fact Sheet - Membrane Bioreactors**. 2008

VIJAYALAKSHMI, K. et al. Synthesis, characterization and applications of nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose film. **J. Nanomed. Nanotechnol**, v. 7, n. 6, p. 419, 2016.

VINE, E. et al. Endocrine (sexual) disruption is not a prominent feature in the pike (*Esox lucius*), a top predator, living in English waters. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 24, n. 6, p. 1436-1443, 2005.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Editora UFMG, Belo Horizonte, Vol. 1, 3ª ed. 2005.

WALKER, C.H. et al. **Principles of ecotoxicology**. CRC press, 2012.

WANG, H. D. et al. Potential biomedical applications of marine algae. **Bioresource technology**, v. 244, p. 1407-1415, 2017.

YAMAMOTO, M.; KURIHARA, I.; KAWANO, S. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Planta**, v. 221, p. 766-775, 2005.

YU, C.; DEEB, R. A.; CHU, K. Microbial degradation of steroidal estrogens. **Chemosphere**, v. 91, n. 9, p. 1225-1235, 2013.

ZHANG, K. et al. Microplastic pollution of lakeshore sediments from remote lakes in Tibet plateau, China. **Environmental pollution**, v. 219, p. 450-455, 2016.

ZHANG, Y. et al. Evaluating removal of steroid estrogens by a model alga as a possible sustainability benefit of hypothetical integrated algae cultivation and wastewater treatment systems. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 11, p. 2544-2553, 2014.