



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Vinícius Malta Rabello

**Ficorremediação do hormônio feminino 17-alfa etinilestradiol (EE2)
pela microalga *Chlorella vulgaris***

Rio de Janeiro

2019

Vinícius Malta Rabello

**Ficorremediação do hormônio feminino 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela
microalga *Chlorella vulgaris***



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

Orientador: Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão

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

Rio de Janeiro

2019

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

R114 Rabello, Vinícius Malta.
Ficorremediação do hormônio feminino 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga chlorella vulgaris / Vinícius Malta Rabello. – 2019.
69f.

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

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Águas residuais - Purificação - Teses. 3. Poluentes - Teses. 4. Algas - Teses. 5. Hormônios - Teses. I. Salomão, André Luís de Sá. II. Teixeira, Lia Cardoso Rocha Saraiva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 628.3

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

Vinícius Malta Rabello

**Ficorremediação do hormônio feminino 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela
microalga *Chlorella vulgaris***

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

Aprovado em: 04 de julho de 2019.

Banca Examinadora:

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

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

Prof^a. Dr^a. Ana Silvia Pereira Santos
Faculdade de Engenharia - UERJ

Dr^a. Rachel Ann Hauser-Davis
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, minha irmã e minha namorada que tanto colaboraram na minha vida e tornaram a realização deste trabalho menos trabalhosa.

Agradeço também a todos os professores com os quais tive contato durante todo este aprendizado, em especial aos meus orientadores o professor André Salomão e a professora Lia Teixeira por todos os ensinamentos sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À toda a equipe do LABIFI por todo o apoio nas análises e experimentos, em especial ao Rodrigo, à Gabriele, Priscila, Grazielle e Camila que se dedicaram tanto durante a realização deste experimento.

Por fim a todos os amigos, colegas de mestrado e de graduação por toda troca de experiências e aprendizado.

RESUMO

RABELLO, Vinícius Malta. **Ficorremediação do hormônio feminino 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga *Chlorella vulgaris***. 2019. 69f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Esgotos domésticos lançados no ambiente representam um dos problemas mais graves e crônicos de saúde humana e ambiental no Brasil. Nas últimas décadas, os micropoluentes ambientais, como o 17-alfa etinilestradiol (EE2), vêm sendo constantemente detectados em concentrações muito baixas nas águas superficiais, pois dentre outras questões, observa-se que as estações de tratamento de esgoto atuais, em sua imensa maioria, não foram concebidas para remoção de micropoluentes. Para este problema o tratamento de águas residuais por processo de ficorremediação está atraindo o interesse, por ser uma tecnologia de baixo custo, boa eficácia e simplicidade operacional. Neste estudo investigou-se através de ensaio de bancada o potencial de biorremoção do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) pela microalga unicelular, *Chlorella vulgaris*. Para isto a microalga foi exposta a concentração de $50\mu\text{gL}^{-1}$ do EE2 em água mineral comparando os resultados aos controles positivo, composto pelo hormônio e água mineral, e negativo, composto somente por água mineral e alga. Os ensaios foram monitorados por 168 horas através de contagem de células, verificação da biomassa seca, análise cromatográfica e teste para verificação de atividade estrogênica (YES). Os resultados obtidos comprovam o papel da alga na degradação do hormônio com a redução da concentração ao término do ensaio de bancada de $29,48\mu\text{gL}^{-1}$, frente aos $11,98\mu\text{gL}^{-1}$ medidos na amostra controle de fotodegradação. Nas primeiras 24 horas foi verificada a maior eficiência das algas na biodegradação do composto, quando em comparação ao controle, que não apresentou degradação neste mesmo período. A produção de biomassa algal não foi afetada pela exposição ao hormônio, sendo ligeiramente superior quando em contato com o mesmo. A avaliação da atividade estrogênica do efluente resultante da ficorremediação apontou uma redução da atividade nas amostras extraída das algas (sorção pelas algas). No entanto, no meio livre houve oscilações com uma redução significativa verificada apenas nas primeiras 24 horas. *C. vulgaris* mostrou-se promissora para o estudo de biodegradação dos micropoluentes ambientais.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*; 17-alfa etinilestradiol (EE2); Ficorremediação; Disruptor endócrino.

ABSTRACT

RABELLO, Vinícius Malta. **Phycoremediation of the female hormone 17-alpha ethinylestradiol by the microalgae *Chlorella vulgaris***. 2019. 69f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Domestic sewage released into the environment represents one of the most serious and chronic human and environmental health problems in Brazil. In the last decades, environmental micropollutants, such as 17-alpha ethinylestradiol (EE2), have been constantly detected in very low concentrations in surface waters. However, most current sewage treatment plants were not designed to remove micropollutants. Wastewater treatment by phycoremediation processes is attracting interest, being a low cost, good effectiveness and operational simplicity technology. In this study, the bioremediation potential of EE2 was investigated using the unicellular microalgae, *Chlorella vulgaris*. This microalga was exposed to 50 µgL⁻¹ of the hormone in mineral water and the results were compared to the positive control, comprising the hormone and water and negative control, composed only by water and algae. The assays were monitored for 168 hours. Cell counts, dry biomass, chromatographic analysis and yeast estrogen screen (YES) tests were performed. Results indicate the role of algae in the degradation of the hormone, showing removal at the end of the batch test of 29.48 µgL⁻¹, compared to 11.98 µgL⁻¹ measured in the photodegradation control sample. The first 24 hours presented the highest algae efficiency when compared to the control, which did not present degradation in the same period. Biomass production was not affected by exposure to the hormone, being slightly higher when in contact with it. Estrogenic activity of the effluent resulting from the phycoremediation indicated a reduction of the activity in the samples extracted from the algae (sorption by the algae). However, in the free environment there were oscillations with a significant reduction verified only in the first 24 hours. *C. vulgaris* was shown to be promising for the study of biodegradation of environmental micropollutants.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; 17-alpha-ethinylestradiol (EE2); Phycoremediation; Endocrine disruptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de estruturas químicas de desreguladores endócrinos.....	21
Figura 2: Estrutura química do 17-alfa etinilestradiol.....	27
Figura 3: Representação da estrutura celular da <i>Chlorella vulgaris</i>	33
Figura 4: Reprodução da <i>Chlorella vulgaris</i> : (a) fase inicial de crescimento; (b) fase final de crescimento; (c) divisão do cloroplasto; (d) início da divisão do protoplasto (e) final da divisão do protoplasto; (f) maturação das células filhas e (g) fase de liberação.....	33
Figura 5: Ensaio controle (n=3): controle positivo somente com água mineral e o hormônio 17-alfa etinilestradiol (transparente) e controle negativo com água mineral e a microalga (verde).....	37
Figura 6: Extração líquido-líquido do 17-alfa etinilestradiol associados às microalgas (adsorvido e absorvido).....	38
Figura 7: Câmara de Neubauer para contagem de células de <i>Chlorella vulgaris</i>	39
Figura 8: Cromatógrafo em fase líquida de ultraeficiência (UPLC), sistema Waters ACQUITY® localizado no LABIFI.....	40
Figura 9: Filtragem da amostra em filtro de membrana para determinação da biomassa seca.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Produção de biomassa de microalgas *Chlorella vulgaris* durante as 168 h dos bioensaios controle negativo e com a presença do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2): (A) avaliação da produção de biomassa seca (mgL^{-1}) a cada 24 h; (B) avaliação no número de microalgas (algasmL^{-1}) a partir da contagem em câmara de Neubauer.....45
- Gráfico 2:** Avaliação dos processos de degradação do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) com e sem a presença das microalgas *C. vulgaris* durante o período de 168 h.....47
- Gráfico 3:** Relação da densidade da microalga *C. vulgaris* com a redução da concentração do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) durante o período de 168 h.50
- Gráfico 4:** Concentração do EE2 (μgL^{-1}) associado às algas no decorrer do experimento (bioabsorvido, bioadsorvido e água intercelular).....50
- Gráfico 5:** Concentração de EE2; nas barras valores para a amostra (livre e associado às algas) e na linha valores obtidos no controle (μgL^{-1}).....51
- Gráfico 6:** Avaliação da atividade estrogênica a partir dos ensaios YES durante os bioensaios de fitorremediação nas amostras de água livre após centrifugação.....52
- Gráfico 7:** Avaliação da atividade estrogênica a partir dos ensaios YES durante os bioensaios de fitorremediação nas amostras sedimentadas de algas após centrifugação (porção associada às algas).....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eficiências mínimas e máximas relatadas em estudos de remoção de fármacos e desreguladores endócrinos nos sistemas de tratamento convencional de esgotos municipais.....	25
Tabela 2: Avaliação da remoção média dos seis fármacos de maior incidência em 21 estudos de remoção/biodegradação por dois tipos de sistemas de tratamento: tanques de <i>wetlands</i> (fitorremediação) e tanques de algas (fitorremediação).....	30
Tabela 3: Parâmetros otimizados do detector MS/MS (Waters) para o composto 17-alfa etinilestradiol.....	41
Tabela 4: Parâmetros estatísticos referentes ao método de quantificação cromatográfica para o composto 17-alfa etinilestradiol.....	41
Tabela 5: Redução da concentração do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) por processos de degradação na presença ou ausência das microalgas <i>C. vulgaris</i> durante o período de 168h.....	48
Tabela 6: Comparação entre a densidade da microalga <i>C. vulgaris</i> e a redução da concentração do hormônio 17 α etinilestradiol (EE2) durante o período de 168 h.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANA	Agência Nacional de Águas
CE50	Concentração Efetiva 50%
E1	Estrona
E2	17-beta etinilestradiol
EE2	17-alfa etinilestradiol
E3	Estriol
EQ-E2	Equivalente estradiol
EGSB	<i>Expanded Granular Sludge Bed</i>
ETE	Estação de tratamento de esgotos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IQA	Índice de Qualidade da Água
LABIFI	Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias
pH	Potencial Hidrogeniônico
POE	Poluente Orgânico Emergente
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PPCP	<i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i>
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SNIS	Sistema Nacional de Informações de Saneamento
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
YES	<i>Yeast Estrogen Screen</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
1. OBJETIVOS.....	14
1.1. Objetivo geral.....	14
1.2. Objetivos específicos.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Poluição das águas superficiais.....	15
2.1.1. Breve histórico do tratamento de efluentes e poluição das águas no Brasil....	17
2.1.2. Desreguladores endócrinos.....	20
2.1.3. Presença de hormônios esteroides em efluentes domésticos.....	22
2.1.4. Capacidade de tratamento dos desreguladores endócrinos em ETEs convencionais e sistemas descentralizados.....	24
2.1.5. Caracterização do 17-alfa etinilestradiol.....	26
2.2. A ficorremediação de efluentes por microalgas.....	28
2.2.1. Utilização de microalgas no tratamento de fármacos e hormônios.....	29
2.2.2. A microalga <i>Chlorella vulgaris</i> e suas características no tratamento de efluentes.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Manutenção e cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	35
3.2. Compostos de interesse	35
3.3. Procedimento preparatório para o ensaio.....	36
3.4. Bioensaios de remoção e biotransformação de EE2 com <i>Chlorella vulgaris</i>	36
3.5. Procedimentos de coleta e análise.....	37
3.6. Análise cromatográfica	39
3.7. Avaliação da atividade Estrogênica - Ensaio YES.....	41
3.8. Análises estatísticas.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Produção de biomassa.....	44
4.2. Ficorremediação na redução da concentração do EE2.....	47
4.3. Densidade de microalgas na redução da concentração do EE2.....	49

4.4.	Avaliação da concentração do hormônio EE2 associados às microalgas (bioabsorvido e bioadsorvido).....	50
4.5.	Análise da estrogenicidade nas amostras coletadas.....	52
5.	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICES.....	66

INTRODUÇÃO

O avanço das tecnologias de produção de alimentos, medicamentos e tratamentos médicos possibilitou melhores condições de vida e um crescente aumento na expectativa média de vida da população mundial (SAMIR; LUTZ, 2017). O crescimento acelerado das populações e a urbanização, porém vêm causando o aumento no consumo de água e degradação de mananciais pelo excesso de cargas de poluição doméstica e industrial, levando a uma contaminação de rios e córregos (TUCCI *et al.*, 2003).

Estima-se que 80% de todas as doenças humanas estejam relacionadas, direta ou indiretamente, à água não tratada e ao saneamento precário (AYACH *et al.*, 2012). No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento (SNIS, 2019), do total de esgoto gerado nos municípios atendidos com abastecimento de água, somente cerca de 46% sofreram algum tipo de tratamento, e cerca de 54% de todo esgoto gerado no Brasil foi lançado *in natura* em corpos hídricos. Tal cenário é absolutamente incompatível com qualquer planejamento que vise à elevação do nível socioeconômico e sanitário de uma população e a preservação ambiental, pois problemas relacionados à saúde estão entre os vários fatores que afetam o bem-estar da sociedade (UHR *et al.*, 2016).

Os objetivos do tratamento de esgoto foram alterados ao longo do século XX. Se entre os anos de 1900 e 1970 os objetivos nos países desenvolvidos eram a remoção de sólidos suspensos, o tratamento de orgânicos biodegradáveis e a eliminação de organismos patogênicos, a partir dos anos 1980 os objetivos do tratamento foram expandidos, com a inclusão da remoção de constituintes que poderiam causar efeitos de longo prazo sobre a saúde e impactos ambientais (METCALF; EDDY, 2016). Mesmo com essa mudança de paradigma, observa-se que as estações de tratamento de esgoto (ETE) atuais, em sua imensa maioria, não foram concebidas para remoção de micropoluentes, o que faz com que muitos destes compostos permaneçam no efluente destas ETEs, seja pela sua persistência e contínua introdução, ou ainda devido à falta de mecanismos para tratar, remover e monitorar estas substâncias (BOLONG *et al.*, 2009).

Os micropoluentes ambientais vêm sendo constantemente detectados nas últimas décadas em concentrações muito baixas nas águas superficiais, na ordem

de grandeza de nanogramas (ppt), ou microgramas por litro (ppb) (BILA; DEZOTTI, 2007). Esta categoria de poluentes é bastante ampla e abriga compostos naturais, produtos farmacêuticos, passando por surfactantes, herbicidas, plastificantes e produtos de cuidados pessoais (AVILA *et al.*, 2014).

O impacto ambiental de muitos compostos farmacêuticos ainda é desconhecido. Entretanto, muitos desses compostos já tiveram comprovação de sua atividade como desreguladores endócrinos (SALOMÃO; MARQUES, 2015). Dentre estes, podem-se citar o 17-alfa etinilestradiol (EE2) (XUE, 2018). Tais substâncias são lançadas principalmente no meio ambiente por ETEs, e são conhecidos por promoverem efeitos adversos na vida aquática (GEHRMANN, 2018). Verifica-se na literatura que, mesmo quando submetido a processos convencionais de tratamento de esgoto, o efluente ainda apresenta contaminação por este hormônio, levando a introdução contínua do EE2 no ambiente (FENT *et al.*, 2006).

A fitorremediação é definida como sendo a utilização de algas para remover e/ou biotransformar substâncias tóxicas (ou não), que podem causar danos ao meio ambiente (HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011). Algumas espécies de microalgas verdes unicelulares, tais como *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus*, e *Raphidocelis subcapitata* têm sido utilizadas (separadas ou em conjunto) em estudos de toxicidade, remoção e biodegradação de fármacos e outros compostos químicos, e até no tratamento de águas residuais (DANESHVAR *et al.*, 2018; MAES *et al.* 2014; SALOMÃO *et al.*, 2014). O tratamento de águas residuais por processo de fitorremediação está atraindo o interesse por ser uma tecnologia de baixo custo (operacionais e infraestrutura), por ter uma alta capacidade de remoção de nutrientes e altas taxas de produção de biomassa, com potencial aplicação para produção de biocombustíveis (DANESHVAR *et al.*, 2018).

Além dos processos de biodegradação as algas unicelulares também possuem outros mecanismos de remoção como a bioacumulação e bioadsorção (LIU, 2018). Poucos estudos foram feitos para avaliar o potencial de microalgas na degradação e/ou remoção de hormônios. Desta forma, a avaliação do potencial de remoção e biodegradação de hormônios por diferentes espécies de microalgas é uma importante estratégia na busca por metodologias eficientes para a remoção de compostos com atividade estrogênica dos efluentes.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Investigar o potencial de biorremocão da microalga unicelular *Chlorella vulgaris*, como alternativa para tratamento do hormônio 17-alfa Etilinilestradiol (EE2).

1.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de produção de biomassa da *C. vulgaris* durante o período de tratamento do EE2.
- Avaliar o potencial de redução da concentração do EE2 pela *C. vulgaris* em água mineral.
- Avaliar a capacidade de bioadsorção e bioabsorção do EE2 pela *C. vulgaris*.
- Avaliar a redução da atividade estrogênica na água mineral contaminada com EE2 durante o período de tratamento por fitorremediação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Poluição das águas superficiais

De acordo com Von Sperling (2005) o conceito de qualidade da água é bastante amplo, pois a água pode incorporar diversas substâncias que impactam diretamente na sua qualidade. Desta forma, a qualidade da água está ligada às condições naturais das bacias onde se localizam os corpos hídricos e também à interferência humana. Com relação às condições naturais, mesmo uma bacia hidrográfica totalmente preservada é afetada pelo escoamento superficial e pela infiltração da água no solo, incorporando sólidos em suspensão, ou dissolvidos, podendo haver alterações da qualidade da água em decorrência da cobertura e composição do solo. Já as interferências antrópicas de como o homem usa e ocupa o solo têm implicação direta na qualidade das águas (VON SPERLING, 2005).

Países em desenvolvimento, como o Brasil, têm ofertado precárias condições de saúde a uma parte significativa da população devido à ausência de serviços de saneamento, levando a incidência de doenças que possuem veiculação hídrica como diarreias, hepatite, cólera, parasitoses intestinais, febre tifoide, dentre outras (TEIXEIRA; GUILHERMINO, 2006).

A disponibilidade de água é a principal questão para um desenvolvimento econômico, social e para a qualidade de vida da população humana, além de ser necessária à sobrevivência das demais espécies vivas do planeta. A disponibilidade de água também é essencial para a agricultura, indústria, dessedentação de animais, dentre outros usos. É importante ressaltar que não só a disponibilidade é importante, mas também que esta seja de qualidade. A poluição das águas e do solo tem impactado na segurança alimentar e representa uma preocupação para a saúde humana. Nas últimas décadas é crescente o número de compostos como pesticidas, metais e outros poluentes encontrados nas águas utilizadas na produção de alimentos (agricultura e pecuária) (LU *et al.*, 2015).

Uma das alternativas para a redução da poluição das águas superficiais é evitar que estes compostos cheguem até os corpos hídricos, com o tratamento adequado dos efluentes gerados pelas atividades humanas. Desde o final do século

XX estão sendo conduzidos estudos sob uma nova ótica de tratamento pela comunidade científica, buscando uma abordagem mais ampla. Apesar de o tratamento biológico focado somente na redução de Carbono, Nitrogênio e Fósforo remover alguns micropoluentes, outros fármacos praticamente não são degradados, comprometendo dessa forma a qualidade das águas (HOLLENDER *et al.*, 2009).

Uma das principais classes de compostos que vêm sendo estudada são os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) sendo estes, persistentes no meio ambiente, possuindo longa meia vida em solos, sedimentos, ar e na biota. Esses poluentes estão presentes nos sistemas aquáticos ao redor do mundo como consequência de sua vasta utilização e dificuldade de tratamento e degradação (OGATA *et al.*, 2009).

Outra classe de grande relevância são os Poluentes Orgânicos Emergentes (POE), ou simplesmente contaminantes emergentes. Estes compostos químicos estão presentes em uma variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, dentre outros. Estes compostos podem ser encontrados nas diferentes matrizes ambientais e biológicas e normalmente não são monitorados ou ainda não possuem legislação regulatória correspondente. Sendo assim, como emergentes, são classificados como potenciais causadores de riscos à saúde humana e de outros organismos (SILVA, 2011). Alguns dos POEs podem ainda ser classificados como substâncias capazes de alterar o funcionamento do sistema hormonal e de sistemas reprodutivo de alguns organismos. Esses compostos são classificados como desreguladores endócrinos (DE) (BILA; DEZOTTI, 2003) e serão abordados no subitem “2.1.2. Desreguladores endócrinos”.

Os POEs podem ser chamados de forma mais ampla de micropoluentes (LUO *et al.*, 2014), haja vista que sua presença ambiental é elevada pela antropização dos ambientes, podendo atingir concentrações nas águas superficiais na ordem de microgramas (ppb) ou até nanogramas (ppt) (LUO *et al.*, 2014; AVILA *et al.*, 2014). A evolução das técnicas analíticas e das metodologias de concentração e extração desses compostos possibilitou maior sensibilidade e menores valores de detecção e quantificação dos compostos em concentrações ambientais, tendo como consequência a elevação no número estudos e publicações dos poluentes emergentes (ROBERTS *et al.*, 2015).

Os fármacos estão em evidência nesta nova ótica de tratamento, pois representam um problema que perpassa quase todos os diferentes tipos de efluentes gerados. Compostos farmacêuticos estão presentes no esgoto doméstico, que contém excretas humanas, e conseqüentemente no efluente bruto e no efluente de ETEs, mesmo em tratamento em níveis secundários (NAKADA *et al.*, 2007). Para outros efluentes, como os esgotos de industriais de indústrias farmacêuticas, são necessários processos complexos e de alto custo, como oxidação avançada, tratamentos químicos e pré-tratamentos para aumentar a biodegradabilidade destes compostos (RODRIGUES *et al.*, 2016). Outro problema diz respeito ao lixiviado de aterros sanitários (chorume), devido ao descarte inadequado de medicamentos e incapacidade das plantas de tratamento tratar a grande variedade de fármacos presentes (LU *et al.*, 2016). Também é possível detectar lançamentos nas áreas rurais de fármacos usados em animais de criação, onde o lançamento direto de fezes e excretas no pasto e a utilização como fertilizante orgânico em culturas agrícolas são a fonte principal de transporte destes compostos para as águas (IGLESIAS *et al.*, 2014).

Desta forma, observa-se que a poluição das águas é um problema de complexidade cada vez maior, onde, ao mesmo tempo em que as técnicas de tratamento evoluem, estão sendo desenvolvidos novos fármacos e produtos químicos, mais resistentes, muitas das vezes com efeitos ainda não identificados, mas que podem representar potenciais riscos. Portanto, diferentes etapas e processos de tratamento devem ser desenvolvidos e estudados para a remoção/degradação dos mais diferentes compostos em efluentes doméstico, municipais, rurais, industriais e até de lixiviado de aterro sanitário.

Este problema é mais grave nos países em desenvolvimento, pois além de apresentar alto consumo de medicamentos, principalmente devido à automedicação, ainda possuem baixos índices de coleta e tratamento do esgoto gerado (KOOKANA, 2014). Um dos exemplos descritos na literatura é referente a concentrações de drogas psicoativas, que em países de alto desenvolvimento humano apresentam valores significativamente inferiores na água superficial, quando comparados aos países de baixo e médio desenvolvimento (CUNHA; ARAUJO; MARQUES, 2017).

2.1.1. Breve histórico do tratamento de efluentes e poluição das águas no Brasil

No Brasil, os primeiros registros do início do esgotamento sanitário remontam a cidade do Rio de Janeiro, então capital do império. Esses registros apontam a construção de “valas negras”, valas contaminadas pelos efluentes domésticos, na época, predominantemente dejetos humanos e de animais (DIAS, 2003). Essas valas eram em grande parte estabelecidas pelo alargamento de pequenos córregos já existentes, na maioria das vezes sem revestimento. Em alguns casos essas valas eram muradas e calçadas, mesmo assim comumente transbordavam causando transtornos como o alagamento de vias públicas e moradias. Há também relatos da construção de fossas negras para o tratamento dos efluentes domésticos gerados (DIAS, 2003).

Apesar da preocupação com os efluentes gerados ser bem antiga, remontando ao império romano e outras antigas civilizações, observa-se que, inicialmente no Brasil, o intuito principal não era realizar o tratamento do efluente gerado, mas sim afastar o mesmo do local poluidor para evitar doenças, havendo uma despreocupação com os impactos da urbanização sobre os meios receptores (NASCIMENTO; BAPTISTA; VON SPERLING, 1999).

As valas permaneceram até o século de XIX. Após esse período foram construídos sistemas de esgotos subterrâneos, já obedecendo aos princípios técnicos modernos e a ideia de se tratar o esgoto antes de lançá-lo em um corpo hídrico. Entretanto, este paradigma acabou sendo aplicado com maior ênfase somente no fim do século XIX e início do século XX, com o crescimento das cidades e o maior adensamento da população. Como exemplo há a promulgação da primeira lei proibindo o lançamento dos efluentes sanitários sem tratamento em galerias ou nos rios de Londres no ano de 1876 (AZEVEDO NETTO, 1959 apud DIAS, 2003).

O adensamento populacional no núcleo urbano, alcançado no fim do século XX, levou a uma menor disponibilidade de áreas para tratamento e disposição dos efluentes gerados. Os métodos mais utilizados até o início do século XX eram a irrigação e a filtração intermitente do efluente. Dessa forma, tornou-se necessário desenvolver métodos que aceleravam os processos naturais de tratamento dos sólidos gerados (carga orgânica), sob condições controladas e que ocupassem menores áreas para instalação dos sistemas de tratamento de esgoto (METCALF; EDDY, 2016).

Os objetivos do tratamento de esgoto também foram alterados ao longo do século XX. Entre os anos de 1900 e 1970 os objetivos nos países desenvolvidos

eram a remoção de sólidos suspensos e flotáveis, o tratamento de orgânicos biodegradáveis e a eliminação de organismos patogênicos. A partir dos anos 1980 os objetivos do tratamento foram expandidos, com a inclusão da remoção de compostos que poderiam causar efeitos de longo prazo sobre a saúde e impactos ambientais (METCALF; EDDY, 2016).

No Brasil, entretanto, este processo foi realizado de forma mais lenta, apesar de um início promissor no que tange a canalização de esgotos, sendo a cidade do Rio de Janeiro considerada por alguns autores como Silva (2002) como a segunda no mundo a ter sistemas de canalização de esgotos adequados, superada apenas pela cidade de Londres. Este sistema de esgotamento sanitário completo, inaugurado em 1864 no bairro da Glória, era constituído por rede coletora de esgotos, elevatória e estação de tratamento. Este processo de tratamento consistia em grades de barras, de limpeza manual e chegava a poços de reunião. Na etapa seguinte era recalcado para cilindros onde havia a desinfecção com aplicação de sulfato de alumínio, cal e carvão vegetal. Posteriormente, o efluente seguia para tanques de sedimentação e tanques de filtração, onde sofria leve filtração passando por camada de cascalho, carvão vegetal e cordagem, antes de ser lançado ao mar (DIAS, 2003). No entanto, este sistema foi alvo de diversas críticas por sua lenta expansão e baixa qualidade no serviço prestado.

No início do século XX, na cidade de São Paulo, iniciativas de tratamento de maior eficácia foram observadas com a inauguração em 1935 da estação de tratamento de esgotos Jesus Neto, a estação mais antiga da SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo). Esta ETE foi pioneira na utilização do sistema de lodos ativados na América latina (SABESP, 2016).

Na cidade do Rio de Janeiro em 1940 foi inaugurada a ETE da Penha. Em junho de 1960 foi ampliada para processar 1.686 L s^{-1} de esgoto, atendendo a aproximadamente 1.000.000 de habitantes (LAMEIRA *et al.*, 2010).

Nos anos 1990 foram verificadas as primeiras iniciativas para geração de efluente para reuso. Desde 1998 a SABESP realiza, na ETE ABC, o aproveitamento dos efluentes secundários de lodos ativados para fins de menor exigência (JUNIOR *et al.*, 2003), entretanto estes efluentes ainda possuem usos bastante restritos.

A ETE Aquapolo, inaugurada em 2012, foi a primeira unidade de grande porte a fornecer água de reuso para a indústria (LOPES; MIERZWA, 2015). Utilizando o efluente da ETE ABC foi firmada uma parceria entre a Odebrecht Ambiental e a

SABESP, para fornecer 650 a 1.000 litros por segundo de água de reuso para o Polo Petroquímico da Região do ABC Paulista.

Entretanto o tratamento de micropoluentes vem sendo negligenciado nas ETEs brasileiras. No caso dos hormônios naturais e sintéticos e dos xenoestrogênios, as concentrações encontradas nas matrizes ambientais brasileiras mostram-se semelhantes, ou até três ordens de grandeza, superiores às concentrações comumente relatadas na literatura internacional (AQUINO *et al.*, 2013). Dessa forma, novas perspectivas de tratamento precisam ser aplicadas.

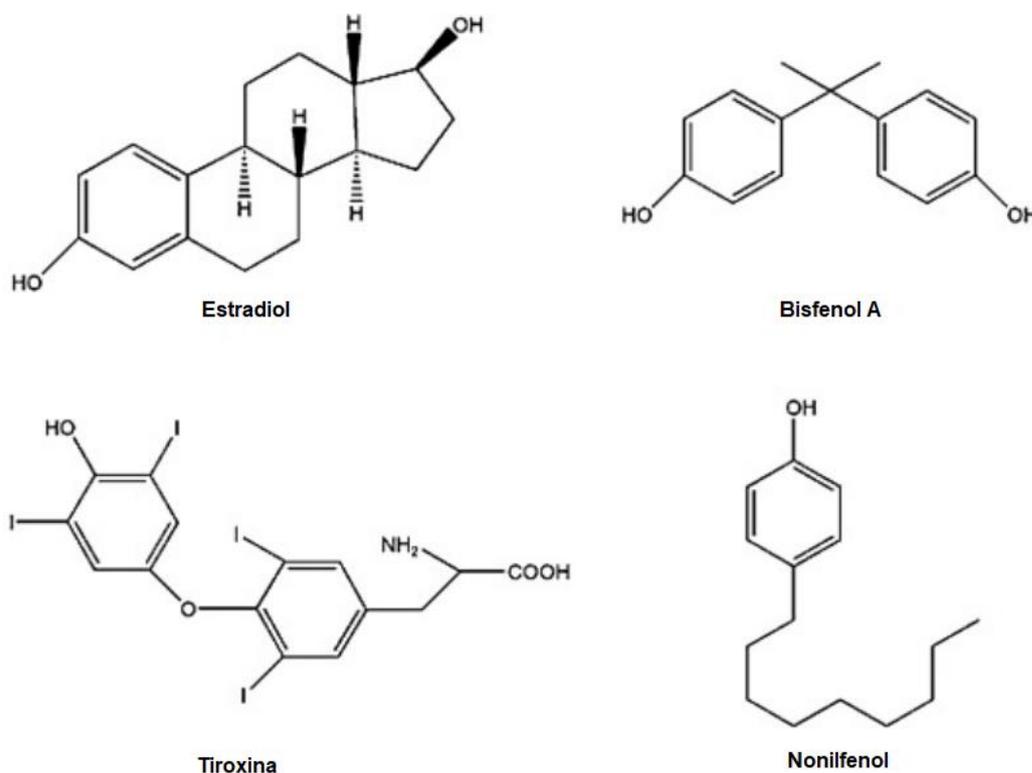
2.1.2. Desreguladores endócrinos

Os desreguladores endócrinos (DE) são classificados como um grupo de substâncias químicas presentes no ambiente que são capazes de interferir ou desregular o sistema endócrino de alguns organismos, assim como dos humanos. Alguns efeitos também podem ser verificados na saúde, no crescimento e na reprodução (BILA; DEZOTTI, 2007), podendo danificar ou alterar diretamente a função dos componentes do sistema endócrino, interagindo com receptores hormonais e alterando o metabolismo.

Os DE podem ser de origem natural, como fitoestrogênios, genisteína e hormônios animais, quanto de origem artificial, sendo sintetizados, como plásticos incluindo o Bisfenol A, solventes, lubrificantes, pesticidas, fungicidas e alguns fármacos (KABIR *et al.*, 2015).

Os DE possuem estruturas diferentes entre si, sendo difícil estabelecer uma relação entre eles (Figura 1). Entretanto existem alguns aspectos estruturais que são indicativos de potencial desregulação endócrina, que são um anel fenólico, sem halogênios, grupos funcionais sulfurados, substituição clorinas, ou brominas próximo às hidroxilas OH no anel fenólico. (KIDD *et al.*, 2012 apud KABIR, 2015).

Figura 1: Exemplos de estruturas químicas de desreguladores endócrinos



Fonte: Adaptado de KIDD *et al.*, 2012.

De acordo com Bila e Dezotti (2007) as maiores preocupações em relação aos DE são se estes podem produzir efeitos tóxicos mesmo em baixas concentrações e quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos mesmo em pequenas concentrações. Para tanto é necessário realizar um contínuo monitoramento ambiental destes compostos para verificação de concentrações seguras, realizando ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” para verificação de toxicidade e identificação de efeitos biológicos destas substâncias.

Entretanto, para uma remediação adequada é necessário investigar continuamente os subprodutos gerados na degradação destes compostos, bem como investigar as interações existentes entre os diversos compostos, pois muitas das vezes os metabólitos dos produtos podem ser mais tóxicos (KABIR, 2015), ou pode haver um grande número de contaminantes não detectados ou mesmo desconhecidos (TANG *et al.*, 2013).

Muitos desses compostos já tiveram comprovação de sua atividade como DE (SALOMÃO; MARQUES, 2015), como o 17-alfa etinilestradiol (EE2) (XUE, 2018). Verifica-se na literatura que, mesmo quando submetido a processos convencionais

de tratamento de esgoto, o efluente ainda apresenta contaminação por este hormônio, levando a introdução contínua do 17-alfa etinilestradiol no meio hídrico (FENT *et al.*, 2006), promovendo efeitos adversos na vida aquática (GEHRMANN, 2018). Diversos medicamentos contraceptivos femininos possuem o EE2 em sua composição e este assunto será abordado no subitem “2.1.5. Caracterização do 17-alfa etinilestradiol”.

Segundo Pal *et al.* (2010) há correlação positiva entre a exposição à desreguladores endócrinos e mudanças no metabolismo desenvolvimento e crescimento dos organismos, com efeitos como feminização, redução de fertilidade, anomalias nos órgãos reprodutivos e mudanças no comportamento sexual de vários organismos aquáticos, como peixes, algas, anfíbios e organismos bentônicos.

Em humanos também são verificados efeitos adversos. Há a correlação entre a diabetes tipo 2 e outras desordens metabólicas para certos compostos classificados como DE, sendo que a exposição durante a gravidez pode ser ainda mais perigosa (ALONSO-MAGDALENA *et al.*, 2011). A exposição prolongada a DE é vista como uma das maiores causas do aumento de doenças reprodutivas e incidência de câncer de mama testículos e ovários em humanos (GIULIVO *et al.*, 2018).

2.1.3. Presença de hormônios esteroides em efluentes domésticos

Os estrogênios são um grupo de hormônios esteroides e tanto os de fontes naturais quanto os sintéticos, possuem grande potencial de causar efeitos de desregulação no sistema endócrino de alguns organismos que habitam os ambientes aquáticos, levando a feminização, redução das taxas de natalidade, má formação neonatal e desenvolvimento de anomalias físicas em peixes (BELHAJ *et al.*, 2015).

Os lançamentos de esgoto, *in natura* ou após tratamento em ETEs, são as principais portas de entrada dos contaminantes emergentes nos corpos hídricos (ZHOU *et al.*, 2009). Nos países em desenvolvimento como o Brasil, em que apenas 43% dos domicílios possuem acesso a coleta e tratamento de esgoto (ANA, 2017), o

lançamento do esgoto bruto nos corpos hídricos realiza esta contaminação de forma ainda mais preocupante e acentuada.

Na Austrália Phan *et al.* (2015), detectou oito esteroides em esgoto bruto (androenediona, estrona, estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, testosterona, androsterona e eticolanona). Dentre os hormônios androgênicos, os metabólitos Androenediona e eticolanona foram encontrados em concentração muito maior que o hormônio primário, testosterona, com este atingindo valores em torno de 5 – 14 ngL^{-1} , enquanto seus metabólitos variaram de 1–5,8 μgL^{-1} e 0,27–0,98 μgL^{-1} . O estrogênio 17- β -estradiol, (principal hormônio excretado pelas mulheres em idade reprodutiva), e seu epímero natural o 17- α -estradiol, foram encontrados, respectivamente, em baixas concentrações 7–54 ngL^{-1} e 5–14 ngL^{-1} . Já para o 17- β -estradiol foi relatado que este degrada-se rapidamente para estrona, isto possivelmente explicaria sua baixa concentração, bem como a elevada concentração da estrona de até 750 ngL^{-1} . Algumas particularidades do local de estudo, como um predomínio de idosos e mulheres em período pós-menopausa podem explicar os altos valores de estrona, já que este é relatado na literatura como o de maior excreção nestas situações.

Outro estudo conduzido em 2014 na Argentina por Valdés *et al.* (2015) detectou os hormônios 17- β -estradiol (E2) e 17- α -etinilestradiol (EE2) na ordem de nanogramas por litro (ngL^{-1}) em efluente de esgoto bruto, e também em efluentes de duas ETEs. As maiores concentrações dos hormônios E2 (631 ngL^{-1}) e EE2 (187 ngL^{-1}) foram observadas justamente nos efluentes de ETEs com somente tratamento primário, demonstrando a ineficácia das plantas de tratamento primário para realizar este tipo de remoção. Já nos pontos amostrados nos estuários receptores dos efluentes apenas em um dos pontos os hormônios foram detectados, sendo observados, no caso do E2, valores elevados na ordem de 369 ngL^{-1} .

Manickum e Jonh (2014) relatam uma maior presença de estrona (E1) no afluente da ETE de 23 ngL^{-1} . Sendo que no efluente, este ficou abaixo do limite de detecção, sendo seguido pelo E2 com a concentração de 20 ngL^{-1} .

Em estudo conduzido na China o E1 e o E2 foram encontrados em todas as amostras do afluente das ETEs na ordem de 69,3–280 ngL^{-1} e 1,3–30 ngL^{-1} , respectivamente (XU *et al.*, 2014), enquanto o EE2 foi detectado em concentrações muito baixas, ou mesmo abaixo do limite de detecção.

Esta divergência de resultados que à primeira vista poderia indicar a imprecisão de algum destes estudos, na verdade serve para demonstrar a variabilidade do esgoto doméstico gerado, o qual está bastante relacionado aos hábitos da população residente, apresentando diferenças hormonais decorrentes da idade, das taxas reprodutivas, do acesso maior a contraceptivos orais e diversos outros fatores. Esta variação na concentração dos diferentes hormônios estrogênicos torna essa questão do tratamento de efluentes domésticos no âmbito dos micropoluentes ainda mais desafiadora, pois quando são estudados ou projetados os sistemas de tratamento que compõem uma ETE é necessário não somente conhecer os processos de tratamento, mas também a população ao qual a planta em questão irá servir.

2.1.4. Capacidade de tratamento dos desreguladores endócrinos em ETEs convencionais e sistemas descentralizados

As ETEs convencionais em operação, de forma geral, não foram desenhadas especificamente para a remoção dos desreguladores endócrinos (DE), tendo sido projetadas para remover, em certos casos, somente matéria orgânica. Outras estações visam além desta remoção tratar particulados, patógenos e nutrientes. Conforme as técnicas de detecção de novas substâncias avançam as estações de tratamento de esgoto convencionais têm suas deficiências de tratamento expostas (Tabela 1). Dessa forma, muitos destes compostos acabam sendo lançados no ambiente sem tratamento adequado (LUO *et al.*, 2014).

De acordo com Aquino *et al.* (2013) de todos os sistemas de tratamentos empregados em escala real, o tratamento por lodos ativados é o que possui mais estudos sobre remoção de fármacos e outros DE. Provavelmente, isto ocorre pelo fato de serem mais utilizados nos países de maior publicação científica, como por exemplo, Estados Unidos, Canadá, Coreia do Sul, China, Japão e países europeus (AQUINO *et al.*, 2013).

Poucos estudos de remoção de fármacos e outros DE são relatados na literatura em ETE compostas por filtros biológicos percoladores (FBP) e reatores

anaeróbios (ex.: reatores UASB, reatores EGSB – *Expanded Granular Sludge Bed*) (AQUINO *et al.*, 2013).

Tabela 1: Eficiências mínimas e máximas relatadas em estudos de remoção de fármacos e desreguladores endócrinos (E1, E2 e EE2) nos sistemas de tratamento convencional de esgotos municipais

Sistema de tratamento	Eficiência de remoção (min/máx.) %		
	E1	E2	EE2
Filtros Biológicos percoladores	50/67	81/92	64
Lodos ativados	22/100	18,5/99,9	33,3/100
Lagoas de estabilização *exceto anaeróbias	1/100	32/98	25/99
Lagoas anaeróbias	96	98	N/A

Fonte: Adaptado de AQUINO *et al.*, 2013; HAMID & ESKICIOGLU, 2012.

A tratabilidade de hormônios como o E2 e o EE2 dos efluentes de ETE convencionais que utilizam processos como sedimentação e lodo ativado é limitada, sendo que a maior parte desta remoção é atribuída a adsorção aos sólidos em suspensão, ou ao lodo, o que acaba provocando contaminação secundária (SILVA *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado na Tunísia, a remoção após tratamento secundário foi de 61% para a E1, 85% para o E2, 87% para o EE2 e 95% para o E3 (BELHAJ *et al.*, 2015), sendo a principal via apontada como responsável por esta realização a biodegradação.

Soluções individuais como fossas sépticas e o descarte em sumidouros, fossas secas, valas abertas e lançamentos em cursos d'água podem ser o principal meio de esgotamento sanitário em locais que ainda não atingiram a universalização do saneamento básico (RODRIGUES, 2011). Dentre as alternativas apresentadas as fossas sépticas são a única considerada pela Agencia Nacional de Águas (ANA) uma forma adequada para tratamento de esgoto, sendo responsável por tratar 12% dos efluentes domésticos gerados no Brasil (ANA, 2017).

Apesar de vantagens como a facilidade de operação e o baixo custo de implantação e operação a capacidade de fossas sépticas para tratar certos compostos com potencial para desregulação endócrina é ainda menor que aqueles observados nas ETEs convencionais. Lambert *et al.* (2016) utilizando rãs da espécie *Rana clamitans* verificou que os machos de regiões de moradia suburbanas servidas

por sistemas de tanques sépticos possuíam níveis de E2 muito superiores aos indivíduos da mesma espécie que habitavam o entorno de áreas servidas por rede coletora de esgoto e ETE.

Alguns processos avançados de tratamento como Carvão Ativado em Pó (PAC), Carvão Ativado Granular (GAC), osmose reversa e ozonização apresentam remoção extremamente elevada mesmo para compostos resistentes (KOVALOVA *et al.*, 2013; GROVER *et al.* 2011; YANGALI-QUINTANILLA *et al.*, 2011). Entretanto, os custos operacionais e a necessidade de mão-de-obra especializada que estes tipos de tratamento demandam inviabilizam sua utilização no tratamento de efluentes domésticos, principalmente em países em desenvolvimento.

Desta forma, soluções de baixo custo e menor complexidade de operação são necessárias para a redução da presença de DE nos efluentes, principalmente em um país de dimensões continentais como o Brasil. Dentre as alternativas para polimento de efluente com menor complexidade operacional pode-se citar os *wetlands* (HERRERA-MELIÁN, 2018; CAI *et al.*, 2012) e o uso de tanques de algas (DE WILT, 2016). Este tema será abordado de forma mais detalhada no item “2.2. A ficorremediação de efluentes por microalgas” desta dissertação.

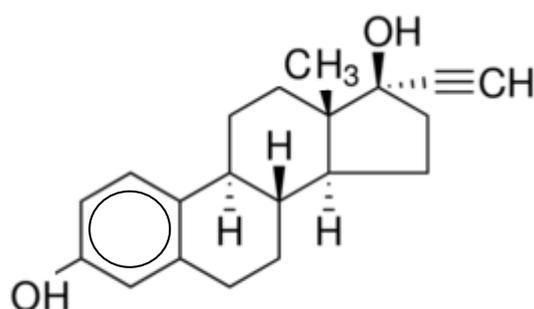
2.1.5. Caracterização do 17-alfa etinilestradiol

Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2013 mais de 14,4 milhões de mulheres residentes no Brasil fazem uso de contraceptivos hormonais como forma de evitar gravidez. Este dado também pode ser validado pelo anuário estatístico do mercado farmacêutico de 2016, (ANVISA, 2017) que classifica as pílulas anticoncepcionais com o princípio ativo de 17 α etinilestradiol, em sua composição, como o sétimo medicamento mais vendido por unidade no Brasil. Na Figura 2 observa-se a estrutura química do 17-alfa etinilestradiol.

O estrogênio sintético 17-alfa etinilestradiol (EE2), componente ativo da maioria dos contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal, é um contaminante emergente muito preocupante, pois apresenta alta potência estrogênica e, por ser muito resistente à biodegradação em estações de tratamento

de efluentes, também é considerado um poluente persistente (HAMID; ESKICIOGLU, 2012). Os hormônios sexuais naturais como o estradiol, assim como os sintéticos como 17-alfa etinilestradiol (EE2) são excretados na urina das mulheres e podem gerar efeitos como a feminização de peixes que vivem no entorno de estações de tratamento de esgotos (SCHLÜSENER; BESTER, 2005). Entretanto, ainda não há estudos que comprovem os efeitos do 17-alfa etinilestradiol na saúde humana com base em exposições ambientais (CAO; CONNEL, 2010).

Figura 2: Estrutura química do 17-alfa etinilestradiol



Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich

A situação é agravada pelo fato de o 17-alfa etinilestradiol ser o mais persistente dos estrogênios, com uma meia vida em água de aproximadamente 17 dias e uma baixa taxa de fotodegradação (ATKINSON *et al.*, 2011), (JÜRGENS *et al.*, 2002), sendo resistente a biodegradação devido a suas propriedades físico-químicas (MAES *et al.*, 2014). Soma-se a esta persistência a grande dificuldade que as estações convencionais de tratamento possuem para tratar este hormônio específico (OLIVEIRA, 2015), o que acaba levando a contaminação dos mananciais pela disposição dos efluentes, mesmo aqueles que sofreram tratamento.

Esta dificuldade de tratamento, aliada ao alto poder estrogênico possível de causar danos ambientais têm estimulado estudos de degradação de EE2 usando diferentes métodos, incluindo fotocatalise heterogênea (HP), foto-Fenton e outros “Processos Avançados de Oxidação”, que são muito eficientes para oxidar e eliminar poluentes perigosos não biodegradáveis (MALATO *et al.*, 2009). Entretanto estes processos possuem alto custo e relativa dificuldade operacional. Dessa forma, para a aplicação em países em desenvolvimento ainda distantes da universalização do tratamento estas alternativas são ainda bastante distantes da realidade.

2.2. A ficorremediação de efluentes por microalgas

O uso de algas para tratamento de esgoto vem mostrando-se uma tecnologia bastante promissora, tanto na redução de nutrientes quando no tratamento de micropoluentes (DE WILT, 2016). O tratamento de águas residuais por processo de ficorremediação está atraindo o interesse da comunidade científica por ser uma tecnologia de baixo custo que, além do grande potencial de remoção de nutrientes, também pode atuar na produção de biomassa (DANESHVAR *et al.*, 2018).

Alguns estudos demonstram que as microalgas possuem potencial de produção de diversos compostos como vitaminas, pigmentos, carotenoides, proteínas, aminoácidos, lipídeos, polissacarídeos, biocombustíveis e outros. Entretanto, o cultivo industrial de microalgas é inviável economicamente devido ao alto preço do meio de cultura artificial utilizado para a produção dessa biomassa. Para isso a utilização de efluentes domésticos como meio de cultivo pode ser uma alternativa interessante para viabilizar este tipo de produção (SYDNEY *et al.*, 2011).

Marchello *et al.* (2015) propõe a utilização de efluentes gerados por estações de tratamento de esgotos com tratamento secundário como meio de cultivo para as microalgas. Essa proposição é feita visando sanar os problemas de baixa qualidade do efluente desses sistemas de tratamento, que geralmente não possuem parâmetros físicos, químicos e biológicos aceitáveis ecologicamente. O despejo contínuo deste efluente pode causar processos danosos, como por exemplo, a eutrofização. Desta forma, os tanques de algas foram propostos para ser aplicados como tratamento terciário, pois a fotossíntese realizada pelas algas auxiliará no aumento da concentração do oxigênio dissolvido, que por sua vez influenciará na degradação da matéria orgânica, reduzindo a DBO. Ao mesmo tempo em que isto ocorre, as bactérias heterotróficas em seus processos de degradação irão produzir dióxido de carbono, amônia, nitrato e fosfatos para o uso das microalgas, formando um conjunto de bastante sucesso, ao polir o efluente e viabilizar um meio de cultura adequado para o cultivo de microalgas que podem ser utilizadas como biofertilizante e biocombustível, usos que não requerem alta pureza para utilização.

Dependendo das características do efluente alguns grupos de algas podem se tornar mais comuns que outros. Os gêneros mais comuns de algas encontrados em efluentes são *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Micractinium*, *Euglena*,

Ankistrodesmus, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Nitzschia*, *Navicula* e *Stigeoclonium* (AMENGUAL-MORRO *et al.*, 2012). No estudo conduzido por Marchello *et al.* (2015) cinco classes de algas foram detectadas (Chlorophyceae, Cyanophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae e Euglenophyceae), sendo que a microalga *Chlorella vulgaris* foi a dominante, respondendo pela quase totalidade dos indivíduos encontrados e apresentando bons resultados de remoção.

Apesar do bom desempenho da espécie *C. vulgaris* na remoção de nutrientes é muito difícil manter uma monocultura de microalgas em um sistema aberto (PARLADÉ *et al.*, 2018). Assim, diversos estudos não acreditam que isso seja um problema, configurando-se como uma vantagem possuir diversas espécies, como demonstram os estudos conduzidos por (KOREIVIENĖ *et al.*, 2014) que obteve alta remoção de nutrientes utilizando consórcio não nativo de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* Outro estudo utilizando um consórcio nativo conduzido por Chinnasamy *et al.* (2010) obteve uma alta produção de biomassa e lipídica.

2.2.1. Utilização de microalgas no tratamento de fármacos e hormônios

As microalgas possuem uma reconhecida eficácia em reduzir a contaminação por fármacos e hormônios tendo diversos mecanismos utilizados para a realização destes processos. De acordo com a literatura, as algas são capazes de biodegradar hormônios por diferentes vias de ação como hidroxilação, redução, degradação da cadeia lateral e isomerização (FARAMARZI, 2008).

Os processos de biotransformação convertem contaminantes orgânicos para obter carbono, ou energia necessários ao seu crescimento (GHASEMI *et al.*, 2011). A biotransformação e o processo de biodegradação de poluentes orgânicos tóxicos podem ser distintos dependendo da espécie da microalga e dependem do tamanho da célula, forma, composição da parede celular e sistema de enzima da espécie (LEI *et al.*, 2007).

Nos últimos anos um crescente número de estudos de remoção dos micropoluentes por sistemas de tratamento baseados em tanques de microalgas têm sido realizados (PARLADÉ *et al.*, 2018). Hormônios como o 17 β -estradiol (E2) e o 17- α -etinilestradiol (EE2) são contaminantes emergentes espalhados por todo o

mundo sendo detectados em efluentes urbanos e industriais (SANTOS *et al.*, 2010). Devido aos seus impactos ambientais e efeitos tóxicos estes foram incluídos na lista de substâncias prioritárias pela comissão da união europeia (CARVALHO *et al.*, 2015), pois mesmo presentes em pequenas concentrações na ordem de nanogramas (ppt) e microgramas (ppb) podem causar efeitos tóxicos à saúde humana e ambiental.

Conforme Wang *et al.* (2016) os hormônios naturais como estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3) e progesterona são facilmente transformados pelas microalgas em alguns dias, enquanto hormônios sintéticos como o EE2 são muito mais persistentes e difíceis de serem tratados no ambiente aquático. Outra questão que não deve ser negligenciada é que os hormônios no ambiente geralmente encontram-se misturados, não estando isolados como nos estudos de bancada. Esta mistura de hormônios pode ter efeitos estimulantes, antagonistas ou competitivos. Estes efeitos decorrentes desta interação podem ter efeitos na remoção, absorção e no metabolismo destes hormônios sintéticos e naturais pelas microalgas (WANG *et al.*, 2016).

Em um estudo de revisão sistemática (Rabello *et al.*, submetido) foram analisados 21 artigos publicados no período de 2006-2018 visando avaliar a remoção de alguns fármacos alvo em *wetlands* e tanques de alga. Neste estudo foram observados que os tanques de alga tiveram resultado superior de remoção/biodegradação em relação aos tanques de *wetlands* para os seis fármacos alvo de maior incidência registrados em efluentes (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da remoção média dos seis fármacos de maior incidência em 21 estudos de remoção/biodegradação por dois tipos de sistemas de tratamento: tanques de *wetlands* (fitorremediação) e tanques de algas (fitorremediação)

Média de remoção do fármaco	Wetland (%)	Algas (%)	Geral (%)
Cafeína	70.24	92.75	72.25
Carbamazepina	12.9	32	15.84
Diclofenaco	19.43	50	20.24
Ibuprofeno	50.29	95.2	54.96
Ketoprofeno	26.79	76.75	31.92
Naproxeno	54.05	70	55.47

Fonte: Rabello *et al.*, submetido.

Segundo Parladé *et al.* (2018) foi demonstrado que um sistema de tratamento composto por algas pode remover completamente 17- β -estradiol (E2) a uma concentração inicial de 2 mgL⁻¹ em sistema de bancada e em escala real em regime de batelada. Esta remoção foi alcançada de forma bastante rápida (12-13h de Tempo de detenção hidráulica (TDH)) ocorrendo tanto na presença quanto na ausência de luz, demonstrando que esta degradação não foi resultado exclusivamente da fotólise. Além disso, foi verificado que quando ocorre um aumento na taxa de degradação do 17- β -estradiol (E2), este é seguido de um aumento na produção de biomassa de algas.

Dentre os inúmeros desreguladores endócrinos o 17-alfa etinilestradiol (EE2) apresenta um elevado potencial estrogênico, sendo aparentemente recalcitrante e indicado como o principal contribuinte para a atividade estrogênica detectada nas amostras ambientais (JOHNSON; WILLIAMS, 2004). Alguns trabalhos vêm sendo conduzidos recentemente para avaliar a degradação deste composto por algas unicelulares observando diversos valores para espécies diferentes. Hom-Diaz *et al.* (2015) observou uma eficiência de remoção entre 60 a 95% para EE2, dependendo das condições da cultura por indivíduos da espécie *Selenastrum capricornutum*, com a biodegradação respondendo por aproximadamente 20 a 54% desta remoção. Neste mesmo estudo para *Chlamydomonas reinhardtii* houve a remoção completa do E2 em todas as condições e para o EE2 em todas as conformações, exceto no efluente de reator anaeróbico que foi observado 76% de remoção. Sole e Matamoros (2016) obtiveram uma alta taxa de remoção (97%) utilizando *Chlorella sp.*, enquanto Wang *et al.* (2016) obteve remoção de até 75,3% com *Scenedesmus sp.*

Um ensaio de bancada funcionando por batelada conduzido por Lai *et al.* (2002) mostrou que o E2 foi rapidamente metabolizado em E1 e outro produto desconhecido por *Chlorella vulgaris*, enquanto o EE2 permaneceu estável. Shi *et al.* (2010) utilizando uma população de algas contendo indivíduos dos gêneros *Anabaena*, *Chlorococcus*, *Spirulina*, *Chlorella* e *Scenedesmus* em ensaio durando 7,5 dias reportou uma remoção de 20% no EE2 enquanto para o E2 este percentual foi o dobro.

Peng *et al.* (2014) conduzindo um estudo por 5 dias e obteve remoção de 95% da progesterona usando as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa*, enquanto que ao utilizar o hormônio sintético Norgestrel, a remoção feita pela *Chlorella pyrenoidosa* foi de apenas 60%, enquanto a *Scenedesmus*

obliquus obteve rendimento elevado removendo este hormônio quase na sua totalidade. As formas principais que as microalgas utilizaram para realizar esta biotransformação destes dois hormônios foram a hidroxilação, a redução e a oxidação. Nakajima *et al.* (2007) entretanto, identificou os processos de glicosilação como os responsáveis pela biotransformação.

Della Greca *et al.* (2008) verificou em seu trabalho que o EE2 foi transformado em três subprodutos pela microalga *Selenastrum capricornutum*; etinilestradiol glicosilado, 3-β-D-glicopiranosil-2-hidroxi-etinilestradiol e 3-β-D-glicopiranosil-6βhidroxi-etinilestradiol. Já ao utilizar a espécie *Scenedesmus quadricauda* o mesmo hormônio foi transformado em 17-alfa-etinil-1,4-estradieno-10,17β-diol-3-one. Estas diferenças de subproduto obtido por espécies diferentes de mesmo gênero demonstram que a biotransformação e seus eventuais subprodutos possuem caráter espécie específico (WANG *et al.*, 2016).

2.2.2. A microalga *Chlorella vulgaris* e suas características no tratamento de efluentes

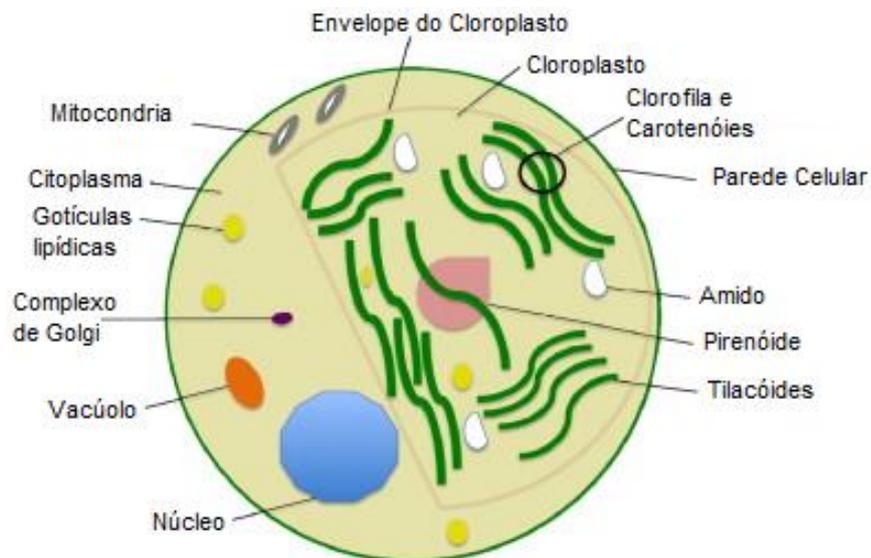
A *Chlorella vulgaris* é uma espécie de microalga unicelular de água doce, pertencente a seguinte classificação taxonômica: Domínio: Eucariota, Filo: Chlorophyta, Classe: Trebouxiophyceae, Ordem: Chlorellales, Família: Chlorellaceae, Gênero: Chlorella, Espécie: *Chlorella vulgaris* (SAFI *et al.*, 2014).

No início do século XX seu alto percentual proteico, até 55% do seu peso seco, atraiu o interesse de pesquisadores alemães para utilização como fonte alimentar não convencional (SAFI *et al.*, 2014). Diversos outros estudos e aplicações foram apontados ao longo do tempo, como usos medicinais para melhorar o sistema imune (MORRIS *et al.*, 2009) e no combate ao câncer (JUSTO *et al.*, 2001). Também são promissoras para utilização como biocombustíveis, além de serem considerados grandes assimiladores de CO₂ (BURLEY, 1953 apud SAFI *et al.*, 2014) nas formas fotoautotrófica e mixotrófica, podendo desta forma reduzir os efeitos dos gases estufa (WANG *et al.*, 2010).

C. vulgaris é microscópica, com diâmetro entre 2–10 μm, com sua parede celular medindo entre 17–21 nm quando madura (YAMAMOTO *et al.*, 2004). Na

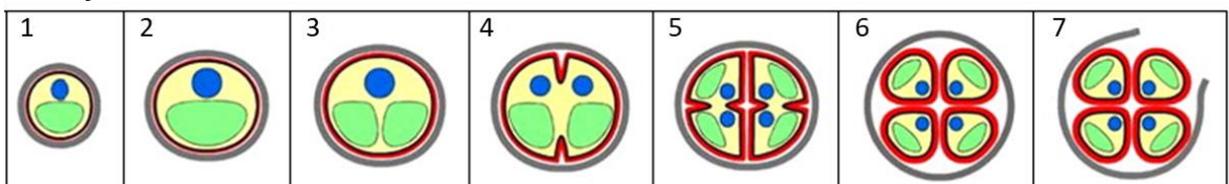
Figura 3 podemos verificar a representação esquemática. Esta microalga se reproduz assexuadamente de forma rápida, através da autoesporulação, que é a forma mais comum de reprodução assexuada observada em algas (SAFI *et al.*, 2014). Este é um tipo de reprodução onde a célula mãe da origem a quatro novas células filhas que rompem a parede celular das células mãe que é consumida pelas novas células formadas, como pode ser observado na Figura 4 (Yamamoto *et al.* 2005).

Figura 3: Representação da estrutura celular da *Chlorella vulgaris*



Fonte: Adaptado de Safi *et al.* (2014).

Figura 4: Reprodução da *Chlorella vulgaris*: (1) fase inicial de crescimento; (2) fase final de crescimento; (3) divisão do cloroplasto; (4) início da divisão do protoplasto; (5) final da divisão do protoplasto; (6) maturação das células filhas e (7) fase de liberação.



Fonte: Adaptado de Yamamoto *et al.* (2005)

As algas também despertaram interesse para ser utilizadas nos processos de tratamento de esgotos. Ao comparar com os processos convencionais de tratamento, como por exemplo, o lodo ativado, as algas podem transformar os poluentes orgânicos para compostos de sua composição celular como lipídeos e

carboidratos, reduzindo a poluição de uma forma ambientalmente menos impactante que a degradação da matéria orgânica com geração de CO₂ realizada pelo lodo ativado (WANG *et al.*, 2010).

As pesquisas utilizando algas para tratamento de efluentes remontam ao início dos anos de 1960, como pode ser observado em artigo publicado por McGriff e McKinney (1972) que desde 1962 vêm estudando a utilização de tanques de algas como um processo secundário-terciário o qual foi chamado da “alga ativada”.

As algas do gênero *Chlorella* são uma das mais utilizadas no tratamento de efluentes, com alta capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo, e redução DQO com diferentes tempos de retenção, variando de 10 horas a 42 dias, associados ou não a bactérias (WANG *et al.*, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e Efluentes (LABIFI), localizado no campus Maracanã da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O experimento ocorreu entre os dias 22/01/2019 e 29/01/2019 com as coletas ocorrendo às 10 horas da manhã, conforme procedimentos experimentais descritos nos próximos subitens.

3.1. Manutenção e cultivo de *Chlorella vulgaris*

A espécie de microalga unicelular fotossintética *C. vulgaris* foi cultivada e mantida em incubadora com fotoperíodo e temperatura controlados de acordo com a Norma ABNT NBR 12648 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011). O cultivo foi replicado numa frequência mensal e o crescimento e desenvolvimento do cultivo foram acompanhados quinzenalmente por contagem em microscópio, medição da clorofila *in vivo* por fluorescência (485 nm de excitação e 685 nm de emissão) e mensalmente por carta controle, segundo ABNT NBR 12648 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011).

3.2. Compostos de interesse

Os solventes utilizados no preparo das soluções estoques foram de grau HPLC (Tedia, Fairfield, EUA). Os padrões cromatográficos e os reagentes usados no ensaio da atividade estrogênica YES foram adquiridos na Sigma-Aldrich. A água ultrapura foi obtida no sistema Milli-Q Plus system da Millipore (USA) com 18,2 M Ω cm de resistividade. O micropoluente selecionado foi 17-alfa etinilestradiol (EE2) (CAS 5763-6).

3.3. Procedimento preparatório para o ensaio

O pré-cultivo das microalgas foi iniciado de três a cinco dias antes do ensaio, ou até que as microalgas apresentassem crescimento exponencial, em meio L.C. Oligo, preparado conforme recomendado no Anexo A da NBR 12648 (ABNT, 2011), e foi mantido em incubadora com temperatura controlada (23-27 °C), luz contínua (4500 lux) e aeração constante. No dia do bioensaio, para evitar a interferência de alguns compostos presentes no meio de cultivo, o inóculo foi centrifugado (15 min, 2000 rpm a 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. Após a centrifugação de todo o volume do inóculo do pré-cultivo, as microalgas sedimentadas foram transferidas gentilmente para os béqueres de ensaio e avolumados com água mineral. A biomassa inicial de microalga do ensaio foi de 10^7 algas/mL.

3.4. Bioensaios de remoção e biotransformação de EE2 com *C. vulgaris*

Os bioensaios foram adaptados tomando como base a Norma ABNT NBR 12648 (ABNT, 2011). Este método, estático, consistiu na exposição da microalga ao EE2 na concentração inicial prevista de $50 \mu\text{gL}^{-1}$, no volume de 1500 mL de água mineral, durante período de 168 h. A água mineral utilizada foi da marca Bioleve, vendida em embalagem do tipo garrafão de 20 Litros com as características descritas no anexo 01.

Foi elaborado um controle negativo utilizando somente água mineral e a microalga. Este controle negativo, de volume de 1000 mL, foi mantido nas mesmas condições da amostra e seus valores de biomassa e densidade de alga foram avaliados em todas as coletas para comparação com a amostra visando determinar o efeito tóxico do EE2 de inibição de crescimento e produção de biomassa (Figura 5).

Para realizar o controle positivo foram utilizados béqueres com volume de 1000ml contendo água mineral e 17-alfa etinilestradiol (EE2) na concentração

nominal inicial de $50 \mu\text{gL}^{-1}$, sendo mantido nas mesmas condições da amostra (Figura 5).

Todo o experimento foi realizado utilizando triplicatas (amostra, controles positivo e negativo) e nas seguintes condições: fotoperíodo 16:8 (claro: escuro); em temperatura de $23\text{-}27,5^\circ\text{C}$; com aeração contínua. As coletas foram realizadas em seis períodos (T0 a T5): 0; 24; 48; 72; 144; 168 h.

Figura 5: Ensaios controle (n=3): controle positivo somente com água mineral e o hormônio 17-alfa etinilestradiol (transparente) e controle negativo com água mineral e a microalga (verde)



Fonte: O autor, 2019

3.5. Procedimentos de coleta e análise

Nos tempos pré-estabelecidos foram coletados 171 mL de amostras. Destes 120 mL foram divididos em 4 Tubos Falcon de 50 mL (4 x 30 mL) para centrifugação e posterior quantificação do EE2 por cromatografia líquida. Os 51 mL restantes foram utilizados para determinação da biomassa, sendo 1 mL (em tubo cônico de 1,5 mL com lugol) para contagem em microscópio e 50 mL para a avaliação da biomassa seca.

Os quatro tubos Falcon com 30 mL de amostra foram centrifugados por 15 minutos em 2.000 rpm a 4 °C. Após centrifugação foi removido cuidadosamente todo sobrenadante, deixando somente o precipitado de algas intacto no fundo do tubo. O sobrenadante foi extraído em SPE em cartucho BondElut® C18 (500 mg, 3 mL), com condicionamento prévio do cartucho, conforme protocolo LABIFI. Ao final, o cartucho foi seco à vácuo por 10 minutos e armazenado em freezer (-20 °C e envolto em papel alumínio). Os analitos foram eluídos do cartucho com 4 mL de metanol e filtrados em filtros seringa de 0,22 µm. Esse volume eluído foi dividido para: análise cromatográfica no UPLC (determinação do composto livre presente na amostra); e para verificação da atividade estrogênica pelo ensaio YES. A determinação e quantificação dos compostos associados à microalga foi realizada com a biomassa de algas obtida na etapa de centrifugação. Uma extração líquido-líquido do 17 α etinilestradiol associados as microalgas (adsorvido e absorvido) foi realizada com a adição de 2 mL de acetato de etila em cada um dos 4 tubos Falcon (total 8 mL) e agitados em Vórtex por 3 min e centrifugado (15 minutos em 2.000 rpm a 4 °C) (Figura 6). Após remover a fração líquida, o processo de extração líquido-líquido foi repetido com a adição de mais 2 mL de acetato de etila. Após a segunda centrifugação foi removida somente a fase contendo acetato de etila.

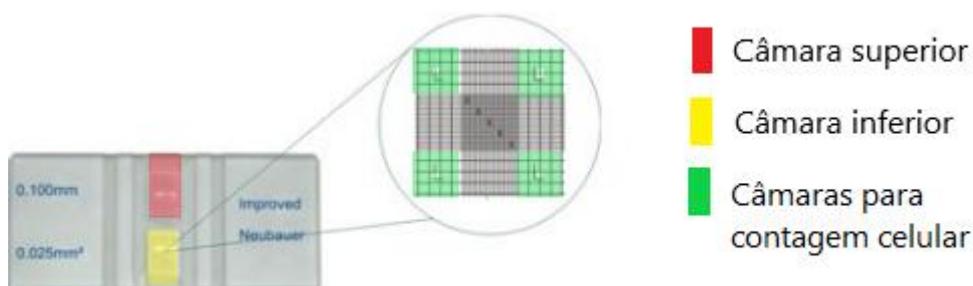
Figura 6: Extração líquido-líquido do 17-alfa etinilestradiol associados às microalgas (adsorvido e absorvido).



Fonte: O autor, 2019

A contagem de células em microscópio foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico da marca Nikon (modelo Eclipse E200, Tóquio, Japão) utilizando lente com 40x aumento. Foram contabilizadas as células visualizadas nos quadrantes laterais (Figura 7) das câmaras superior e inferior. Os resultados foram analisados no programa estatístico GraphPad Prism v.5.0.

Figura 7: Câmara de Neubauer para contagem de células de *Chlorella vulgaris*



Fonte: Adaptado de www.casalab.com.br

A determinação da biomassa seca foi realizada com a filtração à vácuo de 50 mL da amostra em filtro de fibra de vidro 0,2 – 0,6 μm (AP1504700, Merck). Após filtração, as membranas foram secas em estufa de secagem durante 1 hora a 60 $^{\circ}\text{C}$, ou até que fosse obtido peso constante. Nos valores encontrados foi realizada a subtração da pesagem inicial do conjunto de cápsula de porcelana e membrana e realizada conversão para unidade mgL^{-1} .

Os procedimentos para as coletas e análises dos controles negativo e positivo ocorreram da mesma forma e nos mesmos intervalos que os dos ensaios. No entanto, para o controle negativo foram realizadas somente as análises de contagem celular e avaliação da biomassa. Já para o controle positivo foi avaliado somente a quantificação do 17-alfa etinilestradiol livre em água por SPE e posterior análise cromatográfica em UPLC.

3.6. Análise cromatográfica

As amostras foram extraídas em SPE em cartucho BondElut® C18. O condicionamento do cartucho foi à vácuo com fluxo de aprox. 3mLmin^{-1} e com os

seguintes solventes: hexano; acetona; metanol; água ultrapura em pH 3. Em seguida, 100 mL das amostras (em pH 3) foram percolados com fluxo de 3 mLmin^{-1} . O cartucho foi seco à vácuo e armazenado em freezer. A eluição foi realizada com 4 mL de metanol e filtradas em filtro de seringa $0,22 \mu\text{m}$.

O EE2 foi identificado e quantificado por cromatografia em fase líquida de ultra eficiência, sistema Waters ACQUITY® (Figura 8), acoplado ao espectrômetro de massas tipo in tandem, Xevo TQD®, triplo quadrupolo (UPLC-MS/MS Waters). A coluna utilizada foi a AQUITY UPLC® BEH C18, $1,7 \mu\text{m}$, $2,1 \times 50 \text{ mm}$ (Waters) a 50°C , com fluxo de $0,4 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ e com as fases móveis A=água e B=metanol, ambas com 0.01% hidróxido de amônio. O volume de injeção foi de $5 \mu\text{L}$ e o tempo de corrida de 8 min, em modo gradiente, com condição inicial de 90% da fase A até 4 min., em seguida, sendo reduzida para 1% desta fase até 5 min., e finalmente retornando e mantendo-se no estado inicial até o final da corrida. O detector de massas com fonte de electrospray (ESI) foi operado em modo negativo com monitoramento de reações múltiplas (MRM). A voltagem capilar foi de 3,2 kV. A temperatura da fonte e de dessolvatação foi de 150°C e 600°C , respectivamente. N_2 foi usado como gás de cone e de dessolvatação (150 e 1100 Lh^{-1} , respectivamente). O Argônio foi usado como gás de colisão no detector MS/MS ($0,15 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$).

Figura 8: Cromatógrafo em fase líquida de ultraeficiência (UPLC), sistema Waters ACQUITY® localizado no LABIFI



Fonte: O autor, 2019

Nas tabelas 3 e 4 estão descritos os parâmetros do detector, bem como os parâmetros estatísticos utilizados para a quantificação cromatográfica. As concentrações da faixa linear com valores 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 e 1,2 ppm foram diluídas em água ultrapura e preparadas a partir de solução mãe de 1028 ppm em metanol. Os valores foram tratados utilizando o programa R (versão 3.5.2 para Windows) para obtenção equação da curva (Anexo 2).

Tabela 3: Parâmetros otimizados do detector MS/MS (Waters) para o composto 17-alfa etinilestradiol

Modo de ionização (ESI ^(b))	Precursor (m/z)	Quantificação			Confirmação		
		Produto (m/z)	EC ^(a) (V)	Cone (V)	Produto (m/z)	EC (V)	Cone (V)
(+)	295,0	159,0	33	60	145,0	37	60

^(a)EC: Energia de colisão; ^(b)ESI: Ionização por electrospray.

Fonte: O Autor, 2019.

Tabela 4: Parâmetros estatísticos referentes ao método de quantificação cromatográfica para o composto 17-alfa etinilestradiol

Faixa Linear (ppm)	Equção da curva	R ²	Erro Padrão	Incerteza (%)	LQ (ppm)
0,2 - 1,2	Y = 312.9557 + 12.2467x	0,998	0,1411	9,59	0,2

Fonte: O Autor, 2019.

Os valores lidos foram inicialmente concentrados e, desta forma, foi necessário realizar a divisão pelo fator de concentração para encontrar os valores corretos. Nos ensaios para a parte livre e de controle houve concentração de 25 vezes. Já na fração associada às algas houve uma concentração de 240 vezes. A amostra controle foi utilizada para cálculo do fator de recuperação. Foi encontrado o valor de 95,27% que foi multiplicado nos valores do controle e da amostra para correção dos dados apurados em relação à concentração real.

3.7. Avaliação da atividade Estrogênica - Ensaio YES

A avaliação da atividade estrogênica foi realizada a partir do ensaio *Yeast Estrogen Screen* (YES) com cepas recombinantes (modificadas geneticamente) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* segundo protocolo estabelecido por ROUTLEDGE et al., (1996).

Os ensaios foram realizados, em capela de fluxo laminar, com o precipitado da cepa descongelada, em um tubo T (tubo 1) com 10 mL de meio cultivo e agitados (agitação orbital) em 100 rpm/24 h, a 28°C. Em um novo tubo T (tubo 2) foram adicionados 10 mL de meio cultivo + 100 µL de solução do tubo 1. O tubo 2 foi incubado nas mesmas condições anteriores do tubo 1 (agitação orbital de 100 rpm por 24 h, a 28°C). Duas placas de 96 poços foram usadas para diluição e leitura do ensaio.

Na placa 1 (placa de diluição) foi preparada: uma curva de calibração do 17β estradiol (E2) com 12 pontos de concentrações com diluições sucessivas fator 2 (2724 a 1,3301 ng/L, em duplicata, linhas A e C); controle negativo (linhas B e C); e amostras a serem analisadas com 12 poços com concentração em diluições sucessivas fator 2. Na placa 2 (placa de ensaio), foram transferidos 10 µL de cada poço (placa 1) e adicionados 200 µL do meio análise (meio cultivo/CPRG/tubo 1). A placa 2 foi agitada por 2 minutos e incubada por 72 h a 30°C. Após 72 h, a placa 2 foi retirada da incubadora e após 1 h (em temperatura ambiente) foi lida a absorbância nos comprimentos de onda 540 nm e 620 nm, SPECTRAMAX M3 plate reader (Molecular Devices, Califórnia, Estados Unidos da América). O resultado de absorbância obtido para cada poço foi utilizado para calcular a concentração que causou efeito a 50% dos organismos ou Concentração Efetiva 50% (CE50), Citotoxicidade e o Equivalente Estradiol (EQ-E2) de cada amostra, utilizando o Programa Origin (versão 8.0). Os cálculos foram realizados seguindo metodologia proposta por DO NASCIMENTO *et al.* (2018).

3.8 Análises estatísticas

Os resultados de pesagem da biomassa seca (controle e bioensaio); contagem de algas (controle e bioensaio); concentração de EE2 livre (controle degradação e bioensaio) foram analisados estatisticamente no programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.02 para Windows, San Diego, EUA) e comparados o grupo controle negativo (biomassa e contagem de algas) com as amostras coletadas e o controle de degradação com o bioensaio utilizando two-way ANOVA seguido por Bonferroni Posttest ($p < 0,05$). Também foi realizado o cálculo de desvio padrão para todas as

amostras citadas anteriormente, bem como para a amostra contendo o composto associado às algas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

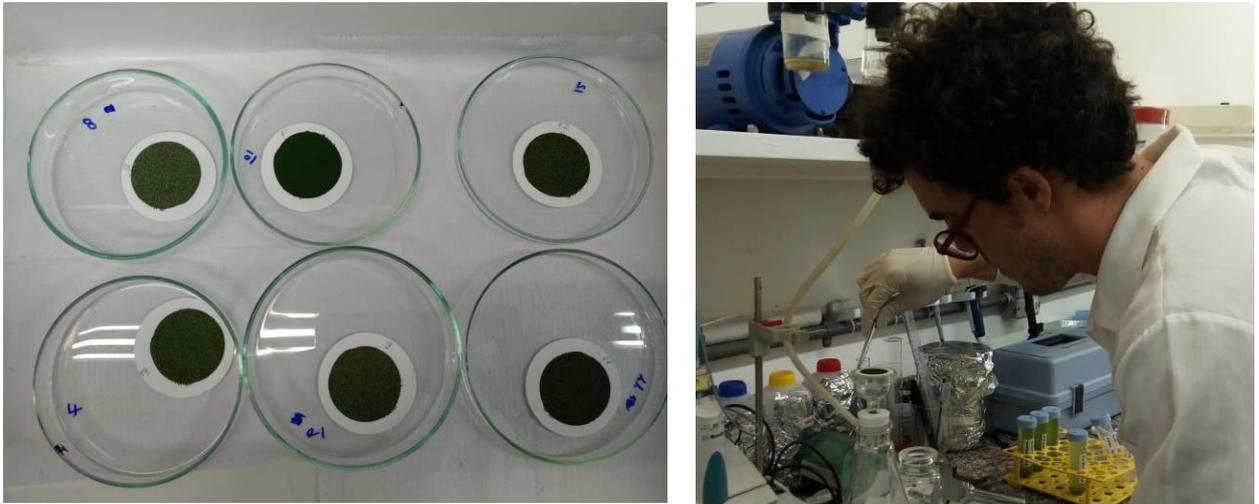
Um protocolo de ensaio de remoção/biodegradação de compostos foi desenvolvido e estabelecido no LABIFI para ser replicável em futuros ensaios com outros compostos passíveis de biodegradação por microalgas. O ensaio foi realizado em água mineral, visando diminuir a interferência dos compostos presentes em meios de cultivos padronizados pela ABNT e reduzir custos experimentais. A utilização de água mineral possibilitou ainda avaliar o potencial de uma microalga mixotrófica *Chlorella vulgaris* na degradação do EE2 para a assimilação de carbono do próprio composto (Wang *et al.*, 2010).

4.1. Produção de biomassa

As análises de biomassa foram realizadas através de dois métodos: pesagem da biomassa seca (Figura 9) e contagem de indivíduos (densidade). Ao longo das 168 h do ensaio, a produção total de biomassa (mg/L) no controle foi de 614,7 mgL⁻¹, configurando um aumento de 174% em relação a biomassa inicial (crescimento diário de 13-33% ou 54-199 mgL⁻¹), e no bioensaio com EE2 a produção foi de 636,7 mgL⁻¹ representando um aumento de 185% (crescimento diário de 17-39% ou 74-236 mgL⁻¹) (Gráfico 1A). Não houve diferença significativa entre a produção de biomassa no controle e no bioensaio com EE2 ($p > 0,05$) durante as 168 h, o que indica que não houve um efeito tóxico crônico do EE2 sobre as microalgas.

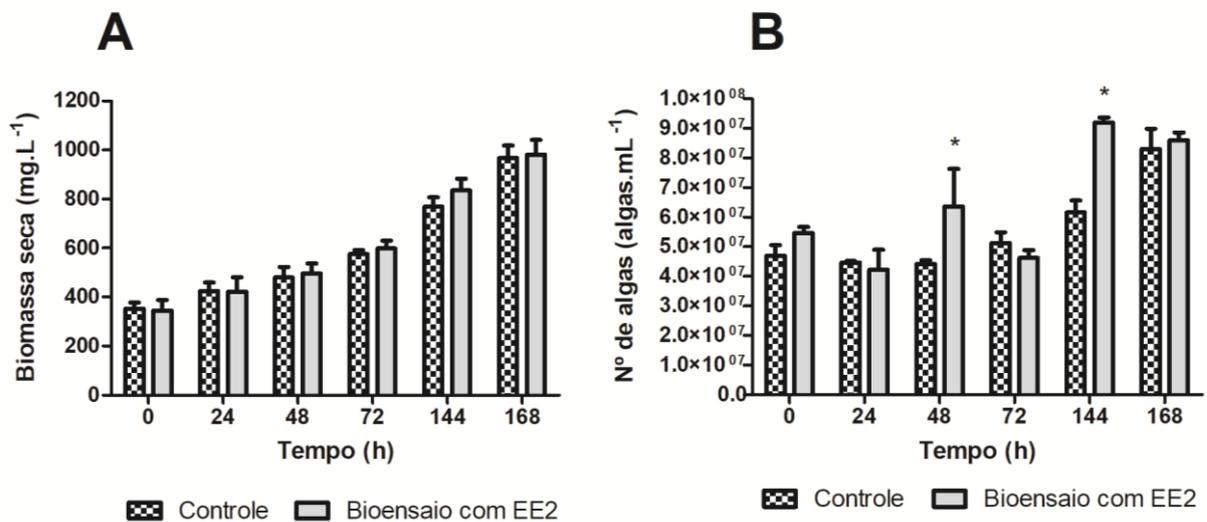
Em relação ao número de algas.mL⁻¹, após 168 h não foi verificada diferença significativa entre o controle e o bioensaio com EE2. No entanto, ao analisar os dados com o teste estatístico *two-way anova* foi verificada uma diferença significativa no número de algas/mL em relação ao tempo de exposição ao EE2 ($p < 0,0001$) e entre os bioensaios ($p = 0,002$). Isto provavelmente está associado às diferenças significativas observadas no bioensaio com EE2 nos tempos 48 h e 144 h onde foram verificados aumentos significativos no número de algas/mL (Gráfico 1B).

Figura 9: Filtragem da amostra em filtro de membrana para determinação da biomassa seca.



Fonte: O autor, 2019

Gráfico 1: Produção de biomassa de microalgas *C. vulgaris* durante 168h dos bioensaios com a presença do hormônio 17α etinilestradiol (EE2) e no controle negativo: (A) avaliação da produção de biomassa seca (mg.L^{-1}); (B) avaliação da densidade de microalgas (algas.mL^{-1}) a partir da contagem em câmara de Neubauer. Diferença significativa ($p < 0,05$) foi verificada nas amostras identificadas com *.



Fonte: O autor, 2019

Os resultados observados nas avaliações de biomassa (seca e contagem) foram próximos. Entretanto, na avaliação do número de algas mL^{-1} foi verificada uma oscilação no crescimento das microalgas quando expostas ao EE2, enquanto no ensaio de biomassa seca houve um crescimento contínuo dos valores. Este fato pode ser explicado pelo fato de que na avaliação da biomassa seca não são distinguidos indivíduos mortos ou vivos, mas sim o total de biomassa presente, ou

em função de variações das contagens que, entretanto, foram minimizadas pela metodologia de contagem dos quadrantes das câmaras superior e inferior, bem como pela realização dos ensaios em triplicatas.

Segundo a literatura, alguns compostos orgânicos como 17-alfa etinilestradiol, levofloxacin e carbamazepina podem ser usados como fonte de carbono, necessários para o crescimento, e com isso, podem não apresentar efeito de inibição do crescimento, interferindo nos resultados dos ensaios (MAES et al., 2014; XIONG et al., 2017).

Mesmo com as oscilações no número de microalgas foi possível verificar que em alguns momentos como 48 h e 144 h, a presença do EE2 pode ter contribuído para a multiplicação das microalgas mixotróficas (Gráfico 1B), levando a um claro aumento da biomassa quando comparados ao controle. Foram verificados aumentos da ordem de 98% no número de indivíduos no período entre 72 e 144 h no ensaio com a presença do EE2, enquanto o controle apresentou um crescimento de 20%. No entanto, na avaliação da biomassa seca esta tendência também foi verificada, porém de forma mais discreta, com um crescimento de 39,4% na biomassa do ensaio com EE2 e 33,4% no controle negativo.

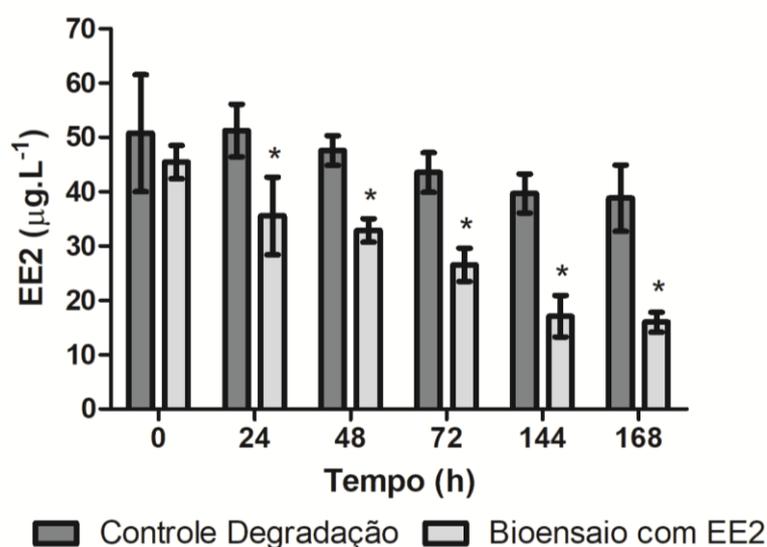
Ao analisar a produção de biomassa durante o experimento total verifica-se que a amostra controle teve um aumento de 174%, enquanto a amostra exposta ao EE2 cresceu 185%. Com relação à densidade de algas (algas/mL) ao final do experimento, esta foi 76% maior no controle e 57% maior na presença do EE2, quando comparadas com a densidade inicial. As algas submetidas ao EE2 apresentaram comportamento mais flutuante, alternando quedas e crescimento. Por outro lado, a amostra controle apresentou um comportamento contínuo de crescimento ao longo do tempo. Ainda cabe ressaltar que a transferência das microalgas de meio de cultivo não acarretou numa inibição de crescimento acentuada que pudesse comprometer o ensaio, assim como no ensaio com a presença do EE2.

Com isso, os resultados demonstram que durante o período de avaliação, mesmo apresentando oscilações no número de algas/mL, após o período de 168 h a produção total de biomassa não apresentou diferença para o controle, reforçando a ausência de efeito tóxico crônico do hormônio sintético EE2 na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$ para a densidade de $10^7 \text{ algasmL}^{-1}$ da microalga *Chlorella vulgaris*.

4.2. Fitorremediação na redução da concentração do EE2

A eficiência da *C. vulgaris* no tratamento para redução da concentração do EE2 (degradação) em relação aos outros processos de degradação, como a fotodegradação, foi significativa, durante as 168h ($p < 0,01$), assim como a cada período de avaliação ($p < 0,01$) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Avaliação dos processos de degradação do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) livre com e sem a presença das microalgas *C. vulgaris* durante o período de 168 h. A diferença significativa ($p < 0,05$) foi verificada nas amostras identificadas com *.



Fonte: O autor, 2019.

O ensaio com as microalgas apresentou uma redução total de 29,5 µgL⁻¹ (65% da concentração inicial de EE2), enquanto na ausência das microalgas (controle positivo) o conjunto de processos denominado de degradação natural foi responsável por reduzir 12 µgL⁻¹ (24% da concentração inicial de EE2).

A maior redução na concentração do EE2 foi verificada nas primeiras 24 h no bioensaio com microalgas, sendo esta de 9,9 µgL⁻¹ (22%); neste mesmo período das 24 h iniciais não foi observada redução no controle (Tabela 3). Cabe ressaltar que a redução de 36% ou 9,5 µgL⁻¹ foi observada num período de 3 dias entre 72-144 h de exposição. Outro fator relevante é que geralmente as concentrações encontradas nos efluentes no Brasil são na faixa de <0,02–5.2 µgL⁻¹ (AQUINO *et al.*, 2013) e

inferiores a concentração de 50 μgL^{-1} utilizada no presente trabalho, sendo esta também inferior a concentração degradada na presença das microalgas nas primeiras 24 h do bioensaio (9,9 μgL^{-1}). Contudo, segundo QUARESMA *et al.* (2018) os efluentes brutos condominiais no Brasil podem apresentar concentrações médias de até 86 μgL^{-1} de EE2. Desta forma a concentração utilizada aproxima-se daquela observada em esgotos brutos o que é interessante para o trabalho, pois qualifica a microalga a atuar em efluentes muito mais tóxicos do que os de um efluente secundário, por exemplo. Além disso é importante ressaltar que 45% da população não possui tratamento de esgotos (ANA, 2017), lançando desta forma esgoto bruto nos corpos hídricos com concentrações elevadas deste composto, como a utilizada neste ensaio.

Tabela 5: Redução da concentração do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) por processos de degradação na presença ou ausência das microalgas *C. vulgaris* durante o período de 168h.

	24h	48h	72h	144h*	168h	Total
Bioensaio com EE2	9,9 (22%)	2,7 (7,5%)	6,4 (19%)	9,5 (36%)	1,1 (6%)	29,5 (65%)
Controle degradação	0,0 (0%)	3,7 (7%)	4,1 (9%)	3,8 (9%)	0,9 (2%)	12,0 (24%)

* redução da concentração do EE2 $\mu\text{g/L}$ equivalente ao período de 3 dias entre 72-144h (96, 120 e 144h).

Fonte: O autor, 2019.

Ao efetuar análise sobre o papel dos fatores bióticos versus fatores abióticos nesta remoção, ao longo do tempo foi possível verificar que inicialmente a microalga (fator biótico) possui papel central na degradação e posteriormente os fatores abióticos como a fotólise e a própria meia-vida do composto acabam sendo também representativos.

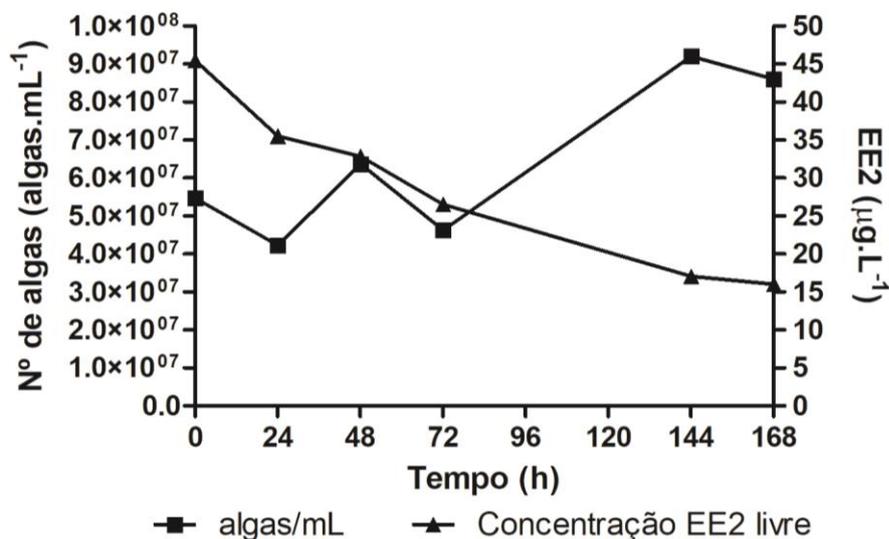
Enquanto a degradação de hormônios esteroides associada às microalgas está relacionada a processos como hidroxilação, glucosilação (DELLA GRECA *et al.*, 2008) e brominação (MAES *et al.*, 2014) a degradação natural do hormônio sem a presença de algas está relacionada quase que em sua totalidade a fotodegradação simples, apresentando produtos como monohidroxi, dihidroxi e derivados dehidrogenados do EE2 mantendo a estrutura esteroide intacta (NEJEDLY; KLIMES, 2017).

4.3. Densidade de microalgas na redução da concentração do EE2

A densidade de 10^7 algas/mL (ou 10^{10} algas/L) utilizada para a realização dos bioensaios de tratabilidade foi fundamental para que o efeito de toxicidade não fosse observado, uma vez que concentrações em ppt (ng/L) são capazes de causar efeito de toxicidade crônica de inibição de crescimento em microalgas em densidades de 10^4 algas/mL (SALOMÃO et al., 2014).

Ao avaliar o efeito da densidade de algas na redução da concentração do EE2 durante o período de tratamento, observou-se que, para alguns pontos, houve um aumento na densidade de algas e uma consequente redução na concentração do EE2 (Gráfico 3). Para fazer esta análise, foi considerado o número de algas/mL inicial de cada período e a redução do EE2 no tempo subsequente (Tabela 4).

Gráfico 3: Relação da densidade da microalga *C. vulgaris* com a redução da concentração do hormônio 17-alfa etinilestradiol (EE2) durante o período de 168 h.



Fonte: O autor, 2019.

Tabela 6: Comparação entre a densidade da microalga *C. vulgaris* e a redução da concentração do hormônio 17 α etinilestradiol (EE2) durante o período de 168 h.

	0-24 h	24-48 h	48-72 h	72-144 h*	144-168 h
Densidade (alga/mL)	5.5×10^7	4.2×10^7	6.4×10^7	4.6×10^7	9.2×10^7
Redução do EE2 (µg/L)	9.9	6.8	4.6	11 (3.7*)	1.9

* Redução do EE2 µg/L proporcional a cada 24 h no período entre 72-144 h (96, 120 e 144 h).
Fonte: O autor, 2019.

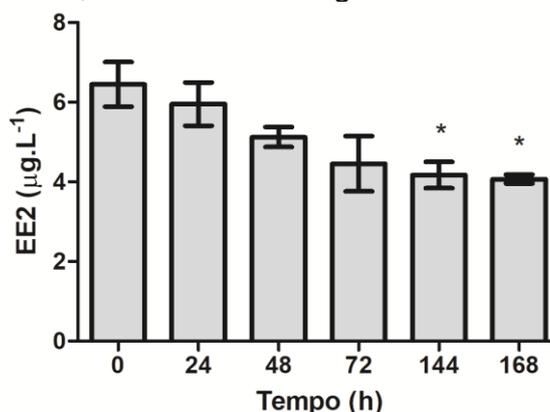
Em um estudo realizado por MAES et al. (2014) com *Desmodesmus subspicatus* na densidade de 10^6 algas/mL também foi constatada uma maior taxa de redução (23%) da concentração inicial ($20 \mu\text{g/L}$) de EE2 nas primeiras 24h. Já segundo HOM-DIAZ et al., (2015), as espécies de microalga *Selenastrum capricornutum* e *Chlamydomonas reinhardtii* foram capazes de reduzir o EE2 por biodegradação em 46% e 41% em um período de 7 dias (168 h).

A compreensão dos resultados de redução da concentração do EE2 pelo tempo de exposição das microalgas pode possibilitar uma melhor eficiência de remoção dos micropoluentes, sendo o tempo de exposição, o tempo de retenção hidráulica (TDH) necessário em tanques de alga com altas densidades a ser aplicado como tratamento terciário em sistemas descentralizados de tratamento de esgoto domésticos.

4.4. Avaliação da concentração do hormônio EE2 associado às microalgas (bioabsorvido e bioadsorvido)

A avaliação da concentração do hormônio EE2 associado às microalgas incluiu a concentração do hormônio adsorvido, absorvido pelas microalgas, bem como a concentração livre na água intercelular. De acordo com o gráfico 4, após 144h houve uma redução significativa da concentração média do EE2 associados a *C. vulgaris* em relação ao T0 (0 h).

Gráfico 4: Concentração do EE2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$) associado às algas no decorrer do experimento (bioabsorvido, bioadsorvido e água intercelular)

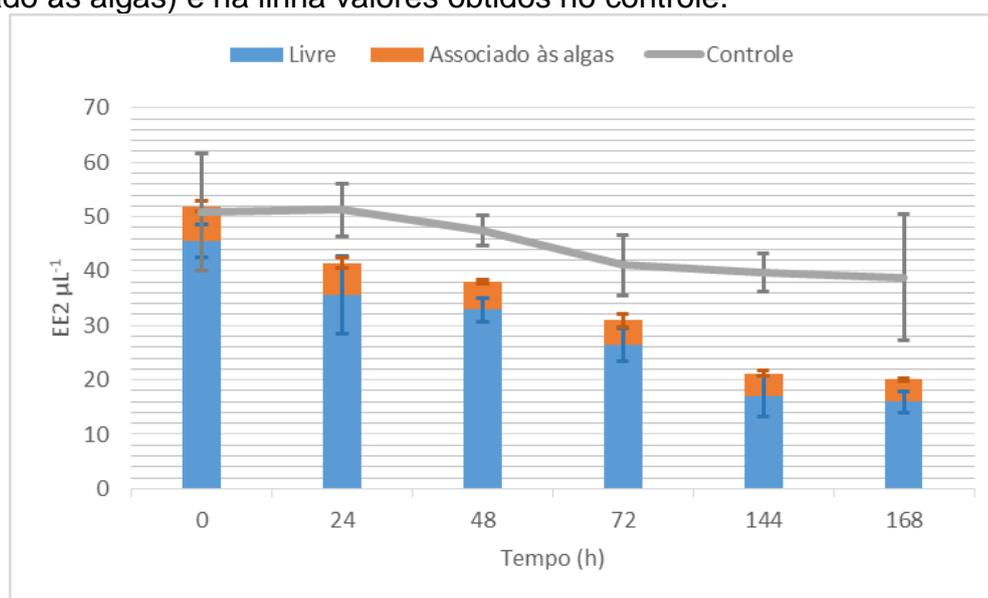


Fonte: O autor, 2019.

Ao analisar a concentração nominal do ensaio (50 µg/L) e a concentração real (45,5 µg/L) em T0 (0 h) foi possível verificar uma diferença de 4,5 µg/L. No entanto, se for somado a concentração real inicial a concentração inicial verificada associada às microalgas de 6,4 µg/L, a concentração final ficaria de 51,9 µg/L.

Essa concentração real calculada se compara a concentração verificada no controle positivo de 50,8 µg/L, que foi preparado juntamente com o ensaio de tratabilidade e a partir da mesma solução mãe, verifica-se que estes apresentaram valores próximos (Gráfico 5). Desta forma, foi possível verificar uma rápida associação do EE2 com a *C. vulgaris* nos instantes iniciais do ensaio, assim como foi possível verificar que o método de extração líquido-líquido utilizado foi capaz de extrair o hormônio EE2 associado às microalgas de forma satisfatória.

Gráfico 5: Concentração de EE2 (µg/L); nas barras valores para a amostra (livre e associado às algas) e na linha valores obtidos no controle.



Fonte: O autor, 2019.

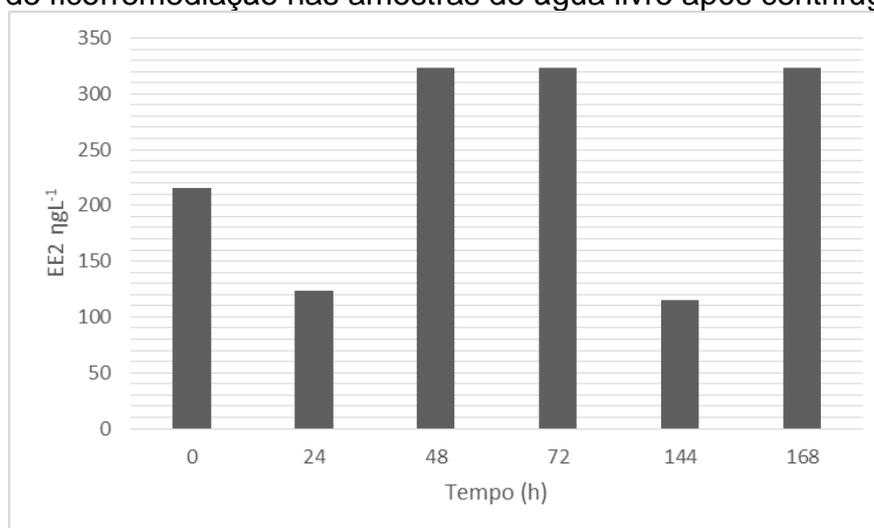
A rápida associação (absorção e adsorção) das microalgas com o EE2 também foi verificada por Wang *et al.* (2016) nos momentos iniciais do ensaio (até 1 h). Cabe ressaltar que o tempo demandado entre o início do ensaio (adição do EE2) e o tempo de coleta e análise pode levar alguns minutos. Outros autores como Shi *et al.* (2010) também verificaram essa rápida sorção de estrogênios por microalgas; e Bai e Acharya (2019), que encontraram o composto triclosan associado a algas no momento T0 do ensaio.

Segundo LIU et al., (2018), a *R. subcapitata* quando exposta a alguns hormônios como 17 β -Estradiol e Dietilstilbestrol foi capaz de remover de forma rápida estes compostos por adsorção e absorção. Segundo HOM-DIAZ et al., (2015), a espécie de microalga *Selenastrum capricornutum* foi capaz de remover por adsorção 46% de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em um período de 7 dias, já a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi capaz de remover por adsorção 40% 17 β -estradiol e 41% de 17 α -etinilestradiol no mesmo período.

4.5. Análise da estrogenicidade nas amostras coletadas

Nas amostras, após as 168 h de bioensaio em água mineral contaminada com EE2, ainda foi constatada uma alta atividade estrogênica verificadas no ensaio YES (Gráfico 6). Este fato já era esperado devido à alta concentração inicial de EE2 no bioensaio (50 $\mu\text{g/L}$) e a eficiência de tratamento ter sido de 65% com uma concentração final de 16 $\mu\text{g/L}$.

Gráfico 6: Avaliação da atividade estrogênica a partir dos ensaios YES durante os bioensaios de fitorremediação nas amostras de água livre após centrifugação



Fonte: O autor, 2019.

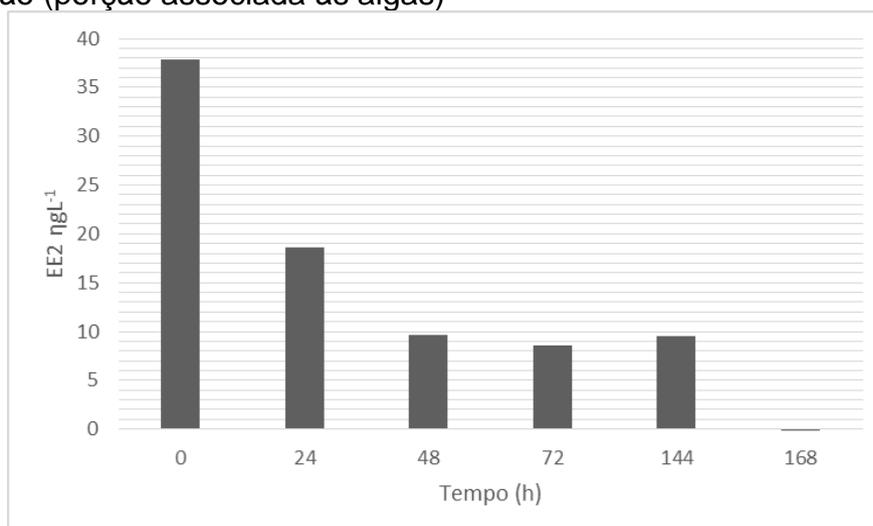
Contudo, nas primeiras 24 h, onde foi verificada a maior taxa redução da concentração diária de EE2, foi também verificada uma redução de 42% na atividade estrogênica. Nos outros períodos de monitoramento a atividade

estrogênica apresentou grandes oscilações o que pode indicar a contribuição microalga *C. vulgaris* na biotransformação do EE2 em outros compostos (metabólitos) com diferentes potenciais de atividade estrogênica, alguns possivelmente mais estrogênicos e outros menos que o EE2, o que levou a essa variação. Para um maior esclarecimento da atividade destes metabólitos serão necessários estudos futuros para monitoramento dos compostos gerados visando uma melhor avaliação da atividade estrogênica resultante.

Já nas amostras resultantes da extração líquido-líquido (associado as microalgas), verificou-se uma significativa redução da estrogenicidade ao longo do tempo, sendo que esta foi totalmente eliminada após 168 horas (Gráfico 7). Esse resultado demonstra que as microalgas possuem a capacidade de biotransformar intracelularmente o EE2 em subprodutos menos estrogênicos.

Todd et al. (2002) demonstrou a biotransformação de compostos ainda mais complexos que o EE2 pela microalga *Chlorella* sp. Entretanto o autor Wang (2016) destacou que a *C. vulgaris* não possuía capacidade de realizar biotransformação, fato este que não foi observado no presente estudo, sendo verificado que mecanismos bióticos tiveram significativo papel na degradação.

Gráfico 7: Avaliação da atividade estrogênica a partir dos ensaios YES durante os bioensaios de fitorremediação nas amostras sedimentadas de algas após centrifugação (porção associada às algas)



Fonte: O autor, 2019.

Poucos estudos foram registrados sobre o potencial de fitorremediação das microalgas de águas doces na degradação e/ou remoção de hormônios

estrogênicos. A espécie de microalgas *Desmodesmus subspicatus* foi capaz de remover, em testes de bancada, quase 70% do hormônio EE2 num período de 72 h, partindo de uma concentração de 20 µg/L (MAES et al., 2014). O mesmo estudo mostrou ainda que a alga biotransformou o hormônio testado, no entanto não foi verificado se houve redução da atividade estrogênica após a biotransformação (MAES et al., 2014). Desta forma, a avaliação do potencial de remoção e biodegradação de hormônios por diferentes espécies de microalga pode ser considerada como uma estratégia atraente na busca por metodologias eficientes de tratamento biológico para a remoção/biodegradação dos compostos com atividade estrogênica presentes nos efluentes domésticos e municipais.

5. CONCLUSÕES

A água mineral foi considerada como uma boa matriz para os bioensaios de fitorremediação com *C. vulgaris*, uma vez que esta, apresentou crescimento contínuo, inclusive no controle negativo. Esta matriz possui custo extremamente menor que os meios padronizados para o cultivo de algas que, além disso, podem apresentar interferência no ensaio YES, conforme verificado em outros bioensaios.

Com relação a produção de biomassa não foi verificada diferença significativa entre o controle e o bioensaio com EE2 durante as 168 h. Isto indica que não houve um efeito tóxico crônico do EE2 na concentração de 50 μgL^{-1} sobre as microalgas na densidade de 10^7 algas.mL⁻¹.

A *C. vulgaris* mostrou-se muito promissora para a redução de elevada concentração inicial de hormônio EE2 (50 μgL^{-1}) em água mineral, apresentando apenas uma redução na população de indivíduos no início, o que não afetou o desempenho superior do ensaio com a microalga frente ao controle, com remoção média do hormônio EE2 de 29,48 μgL^{-1} , representando 64,8% do total, frente a 11,98 μgL^{-1} (23,6%) observados na amostra controle. A elevada densidade de algas (10^7 algas/mL) pode ser apontada como fator determinante para este desempenho.

Durante as primeiras 24 h a microalga *C. vulgaris* e os processos de biodegradação a ela associados foram responsáveis por uma grande redução na concentração do EE2 (9,9 μgL^{-1}) enquanto o controle positivo (de degradação) não apresentou qualquer redução. Foi observada uma rápida absorção do EE2 pelas microalgas, sendo o intervalo de tempo T0 aquele com a maior concentração. Posteriormente, o hormônio associado ao sedimentado de algas apresentou redução significativa ao longo do experimento, acompanhando a tendência à redução da disponibilidade no meio.

A atividade estrogênica do EE2 associado às algas foi reduzida ao longo das 168 h de ensaio, enquanto o hormônio livre em água apresentou oscilações ao longo do mesmo período. Nas primeiras 24 horas, momento em que foi verificada a maior taxa de remoção diária do EE2, a microalga *C. vulgaris* e os processos de biodegradação a ela associados foram responsáveis por uma redução de 42% na atividade estrogênica, o que indica que as algas possuem papel na

biotransformação do EE2 em outros subprodutos que podem possuir maior e menor potencial estrogênico que o EE2.

Como próximos passos estão previstas a detecção e a quantificação dos metabólitos do EE2 pela *C. vulgaris*, bem como a realização do mesmo bioensaio com concentração inicial menor de EE2, com valores de partida entre 1,0 e 5,0 μgL^{-1} para verificação de possível remoção da atividade estrogênica.

REFERÊNCIAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) - NBR 12648. Rio de Janeiro, Brasil: [s.n.], 2011.
- ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 7, n. 6, p. 346, 2011.
- AMENGUAL-MORRO, C.; NIELL, G. M.; MARTÍNEZ-TABERNER, A. Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. *Journal of Environmental Management*, v. 95, p. S71-S76, 2012.
- ANA. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, Atlas Esgotos: Despoluição de Bacias Hidrográficas. Agência Nacional de Águas, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Brasília, 2017. 88p. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/ATLASESGOTOSDespoluicaoodeBaciasHidrograficasresumoExecutivo_livro.pdf> Acesso em 16 de Maio de 2019.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Anuário estatístico do mercado farmacêutico 2016. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2017 Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/374947/3413536/anu%C3%A1rio+Estat%C3%ADstico+do+Mercado+Farmac%C3%AAutico+-2016/485ddf50-a37f-469f-89e5-29643c5c9df5>> Acesso em: 01 de Maio de 2018.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 18, p. 5-9, 2013.
- ATKINSON, S. K. et al. Environmental factors affecting ultraviolet photodegradation rates and estrogenicity of estrone and ethinylestradiol in natural waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2011.
- AVILA, C. et al. 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.
- AYACH, L. R. et al. Saúde, saneamento e percepção de riscos ambientais urbanos/Health. *Caderno de Geografia*, v. 22, n. 37, p. 47-64, 2012.
- BAI, X.; ACHARYA, K. Removal of seven endocrine disrupting chemicals (EDCs) from municipal wastewater effluents by a freshwater green alga. *Environmental Pollution*, v. 247, p. 534-540, 2019.
- BELHAJ, D. et al. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). *Science of the Total Environment*, v. 505, p. 154-160, 2015.

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

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

BOLONG, N., ISMAIL, A. F., SALIM, M. R., MATSUURA, T. 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.

CAI, K. et al. Treatment of estrogens and androgens in dairy wastewater by a constructed wetland system. *Water research*, v. 46, n. 7, p. 2333-2343, 2012.

CAO, Q.; YU, Q.; CONNELL, D. W. Fate simulation and risk assessment of endocrine disrupting chemicals in a reservoir receiving recycled wastewater. *Science of the total environment*, v. 408, n. 24, p. 6243-6250, 2010.

CARVALHO, R. N. et al. Development of the first watch list under the environmental quality standards directive. *Sustainability EEJRCIfEa. Publications Office of the European Union, Luxembourg*, v. 166, 2015.

CHINNASAMY, S. et al. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications *Bioresource technology*, v.101, p. 3097-3105, 2010.

CUNHA, D. L.; ARAUJO, F. G.; MARQUES, M. Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity - a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 31, p. 24076-24091, 2017.

DANESHVAR, E. et al. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. *Bioresource technology*, v. 255, p. 104-110, 2018.

DELLA GRECA, M. et al. Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere*, v. 70, n. 11, p. 2047-2053, 2008.

DE WILT, A. et al. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal of hazardous materials*, v. 304, p. 84-92, 2016.

DIAS, A. P. *Análise da interconexão dos sistemas de esgotos sanitário e pluvial da Cidade do Rio de Janeiro: Valorização das coleções hídricas sob perspectiva sistêmica*. 2003. 244f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

DO NASCIMENTO, M. T. L. et al. Determination of water quality, toxicity and estrogenic activity in a nearshore marine environment in Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 149, p. 197-202, 2018.

FARAMARZI, M. A.; ADRANGI, S.; YAZDI, M. T. Microalgal biotransformation of steroids. *Journal of phycology*, v. 44, n. 1, p. 27-37, 2008.

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

GEHRMANN, L. et al. (Anti-) estrogenic and (anti-) androgenic effects in wastewater during advanced treatment: comparison of three in vitro bioassays. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 5, p. 4094-4104, 2018.

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

GHASEMI, Y.; RASOUL-AMINI, S.; FOTOOH-ABADI, E. The biotransformation, biodegradation, and bioremediation of organic compounds by microalgae 1. *Journal of phycology*, v. 47, n. 5, p. 969-980, 2011.

GROVER, D. P. et al. Improved removal of estrogenic and pharmaceutical compounds in sewage effluent by full scale granular activated carbon: impact on receiving river water. *Journal of hazardous materials*, v. 185, n. 2-3, p. 1005-1011, 2011.

HANUMANTHA RAO, P. et al. Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. *Water Sa*, v. 37, n. 1, 2011.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, v. 46, n. 18, p. 5813-5833, 2012.

HERRERA-MELIÁN, J. A. et al. Study on the removal of hormones from domestic wastewaters with lab-scale constructed wetlands with different substrates and flow directions. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 21, p. 20374-20384, 2018.

HOLLENDER, J. et al. Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. *Environmental science & technology*, v. 43, n. 20, p. 7862-7869, 2009.

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.

IBGE. Censo Demográfico 2010, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013.

IGLESIAS, A. et al. Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 3, p. 2367-2377, 2014.

JOHNSON, A. C.; WILLIAMS, R. J. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental science & technology*, v. 38, n. 13, p. 3649-3658, 2004.

JUNIOR, A.P; MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H. F. *Reúso de água*. Ed. Manole Ltda, Barueri, 2003. 550p.

JÜRGENS, M. D. et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 21, n. 3, p. 480-488, 2002.

JUSTO, G. Z.; SILVA, M. R.; QUEIROZ, M. L. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, v. 23, n. 1, p. 119-132, 2001.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 40, n. 1, p. 241-258, 2015.

KOOKANA, R. S. et al. Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: an examination of risk factors in low-, middle-and high-income countries. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1656, 2014.

KOVALOVA, Lubomira et al. Elimination of micropollutants during post-treatment of hospital wastewater with powdered activated carbon, ozone, and UV. *Environmental science & technology*, v. 47, n. 14, p. 7899-7908, 2013.

KOREIVIENĖ, J. et al. Testing of *Chlorella/Scenedesmus* microalgae consortia for remediation of wastewater, CO₂ mitigation and algae biomass feasibility for lipid production. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, v. 22, n. 2, p. 105-114, 2014.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 2, p. 859-864, 2002.

LAMBERT, M. R. et al. Septic systems, but not sanitary sewer lines, are associated with elevated estradiol in male frog metamorphs from suburban ponds. *General and comparative endocrinology*, v. 232, p. 109-114, 2016.

LAMEIRA, A. B. et al. Diagnóstico e alternativas para a recuperação ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Guandu (BHRG)-RJ. *Embrapa Solos-Documentos (INFOTECA-E)*, 2010.

LEI, A. et al. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource technology*, v. 98, n. 2, p. 273-280, 2007.

LIU, W. et al. Removal and Biodegradation of 17 β -Estradiol and Diethylstilbestrol by the Freshwater Microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *International journal of environmental research and public health*, v. 15, n. 3, p. 452, 2018.

LOPES JR, L. A. C.; MIERZWA, J. C. Influência de variáveis climáticas no desempenho do sistema aquapolo de produção de água de reúso. In: 2º CONGRESSO INTERNACIONAL DE GESTÃO DA ÁGUA E MONITORAMENTO AMBIENTAL, 2015, Aracaju. Disponível em: <http://www.resag.org.br/congressoresag2015/anais/img/pdfs/poster_128.pdf>

LU, Y. et al. Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environment international*, v. 77, p. 5-15, 2015.

LU, M. et al. Occurrence and treatment efficiency of pharmaceuticals in landfill leachates. *Waste management*, v. 55, p. 257-264, 2016.

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.

MAES, H. M. et al. Uptake, elimination, and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol by the freshwater alga *Desmodesmus subspicatus*. *Environmental science & technology*, v. 48, n. 20, p. 12354-12361, 2014.

MALATO, S. et al. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. *Catalysis today*, v. 147, n. 1, p. 1-59, 2009.

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

MARCHELLO, A. E. et al. Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 75-84, 2015.

MCGRIFF JR, E. C.; MCKINNEY, R. E. The removal of nutrients and organics by activated algae. *Water Research*, v. 6, n. 10, p. 1155-1164, 1972.

METCALF, L.; EDDY, H. P. *Tratamento de efluentes e recuperação de recursos*. 5ª Ed. AMGH, Porto Alegre, 2016. 1980p.

MORRIS, H. J. et al. Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition. *Biotechnología Aplicada*, v. 26, n. 2, p. 162-165, 2009.

NAKADA, N. et al. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water research*, v. 41, n. 19, p. 4373-4382, 2007.

NAKAJIMA, Nobuyoshi et al. Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. *Chemosphere*, v. 69, n. 6, p. 934-941, 2007.

NASCIMENTO, N. O.; BAPTISTA M. B.; VON SPERLING, E. Problemas de Inserção Ambiental de Bacias de Detençãoem Meio Urbano. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 20., 1999, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: ABES, 1999. 9 p. Disponível em: < <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/brasil20/v-029.pdf> > Acesso em 13 de Março de 2019.

NEJEDLY, T.; KLIMES, J. A model of natural degradation of 17- α -ethinylestradiol in surface water and identification of degradation products by GC-MS. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 29, p. 23196-23206, 2017.

OGATA, Y. et al. International pellet watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine pollution bulletin*, v. 58, n. 10, p. 1437-1446, 2009.

OLIVEIRA, H. G. et al. Remediation of 17- α -ethinylestradiol aqueous solution by photocatalysis and electrochemically-assisted photocatalysis using TiO₂ and TiO₂/WO₃ electrodes irradiated by a solar simulator. *Water research*, v. 72, p. 305-314, 2015.

PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the total environment*, v. 408, n. 24, p. 6062-6069, 2010.

PARLADÉ, E. et al. Effect of cultivation conditions on β -estradiol removal in laboratory and pilot-plant photobioreactors by an algal-bacterial consortium treating urban wastewater. *Water research*, v. 137, p. 86-96, 2018.

PENG, F. 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.

PHAN, H. V. et al. Nutrient and trace organic contaminant removal from wastewater of a resort town: Comparison between a pilot and a full scale membrane Bioreactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 102, p. 40-48, 2015.

QUARESMA, A. DE V. et al. Ocorrência de fármacos e desreguladores endócrinos em esgoto bruto e tratado na cidade de Belo Horizonte (MG). *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 23, n. 6, p. 1199-1211, 2018.

ROBERTS, J. et al. Tracking multiple modes of endocrine activity in Australia's largest inland sewage treatment plant and effluent-receiving environment using a panel of in vitro bioassays. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 34, n. 10, p. 2271-2281, 2015.

RODRIGUES, I. O. Abrangência dos serviços de saneamento. In: IBGE (Ed.). Atlas de Saneamento. Rio de Janeiro: IBGE, p. 16, 2010.

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

SABESP. Estação de Tratamento de Esgoto mais antiga também é a pioneira em inovação. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/imprensa/noticias-detalle.aspx?secaold=65&id=7261>> Acesso em: 19/12/2018

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.

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.

SALOMÃO, A. L. S. et al. Effects of Single and Mixed Estrogens on Single and Combined Cultures of *D. subspicatus* and *P. subcapitata*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 93, n. 2, p. 215-221, 2014.

SAMIR, K. C.; LUTZ, W. The human core of the shared socioeconomic pathways: Population scenarios by age, sex and level of education for all countries to 2100. *Global Environmental Change*, v. 42, p. 181-192, 2017.

SANTOS, L. H. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, v. 175, n. 1-3, p. 45-95, 2010.

SCHLÜSENER, M. P.; BESTER, K. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *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.

SHI, W. et al. Removal of estrone, 17 α -ethinylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, n. 4, p. 824-833, 2010.

SILVA, J. R. *Os esgotos na cidade do Rio de Janeiro – História do sistema de esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: Corbã, 2002. 356p.

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

SILVA, C. G. A. et al. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SNIS. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos 2017. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, Ministério do Desenvolvimento Regional. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2017>> Acesso em: 15/03/2019

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.

SYDNEY, E. B. et al. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3291-3294, 2011.

TEIXEIRA, J. C.; GUILHERMINO, R. L. Análise da associação entre saneamento e saúde nos estados brasileiros, empregando dados secundários do banco de dados indicadores e dados básicos para a saúde 2003-IDB 2003. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 11, n. 3, p. 277-82, 2006.

TANG, Xin et al. Removal potential of anti-estrogenic activity in secondary effluents by coagulation. *Chemosphere*, v. 93, n. 10, p. 2562-2567, 2013.

TUCCI, C. E. M.; HESPANHOL, I.; NETTO, O. M. C. Cenários da gestão da água no Brasil: uma contribuição para a "Visão Mundial da Água". *Interações*, v. 1980, p. 90, 2003.

TODD, S. J.; CAIN, R. B.; SCHMIDT, S. Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae. *Biodegradation*, v. 13, n. 4, p. 229-238, 2002.

UHR, J. G. Z; SCHMECHEL, M.; UHR, D. A. P. Relação entre saneamento básico no Brasil e saúde da população sob a ótica das internações hospitalares por doenças de veiculação hídrica. *Revista de Administração, Contabilidade e Economia da Fundace*, v. 7, n. 2, 2016.

VALDÉS, M. E. et al. Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface waters of the "Pampas" region and the "Rio de la Plata" estuary (Argentina). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 94, n. 1, p. 29-33, 2015.

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

WANG, L. et al. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 162, n. 4, p. 1174-1186, 2010.

WANG, P.; WONG, Y.; TAM, N. F. Green microalgae in removal and biotransformation of estradiol and ethinylestradiol. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 1, p. 263-273, 2016.

YAMAMOTO, M. et al. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of plant research*, v. 117, n. 4, p. 257-264, 2004.

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, n. 6, p. 766-775, 2005.

YANGALI-QUINTANILLA, V. et al. Nanofiltration vs. Reverse osmosis for the removal of emerging organic contaminants in water reuse. *Desalination and water treatment*, v. 34, n. 1-3, p. 50-56, 2011.

XIONG, J., et al.. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of Hazardous Materials*.v. 323, p.212–219, 2017.

XUE, W. et al. Roles of membrane and organic fouling layers on the removal of endocrine disrupting chemicals in microfiltration. *Journal of Environmental Sciences*, 2018.

XU, Y. et al. Occurrence and removal of free and conjugated estrogens in wastewater and sludge in five sewage treatment plants. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 16, n. 2, p. 262-270, 2014.

ZHOU, J. L. et al. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, n. 2-3, p. 655-661, 2009.

ANEXO 1: Características físico-químicas da água mineral bioleve (20l)

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	Fonte Jatobá 1⁽¹⁾
pH à 25°C	7,41
Temperatura da água na fonte	22,5°C
Condutividade Elétrica a 25°C	131,5 µS/cm
Resíduo de evaporação a 180°C, calculado	112,70mg/L
Radioatividade na fonte a 20°C e 760 mmHg	5,04 maches
Bário (mgL ⁻¹)	0,024
Bicarbonato (mgL ⁻¹)	93,78
Cálcio (mgL ⁻¹)	15,000
Cloreto (mgL ⁻¹)	0,88
Estrôncio (mgL ⁻¹)	0,056
Fluoreto (mgL ⁻¹)	0,02
Fosfato (mgL ⁻¹)	-
Magnésio (mgL ⁻¹)	8,180
Nitrato (mgL ⁻¹)	3,02
Potássio (mgL ⁻¹)	1,670
Sódio (mgL ⁻¹)	3,420
Sulfato (mgL ⁻¹)	0,14

⁽¹⁾Lindóia, SP.

ANEXO 2: Construção da equação da curva 17-alfa etinilestradiol (0,2 – 1,2).
Resultados utilizando o programa “R”

Resultado 17-alfa etinilestradiol

Call:

lm(formula = area17 ~ stdconc17)

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-554.77	-76.87	-8.99	114.70	375.78

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	312.9557	68.6441	4.559	0.0000712 ***
stdconc17	12.2467	0.0959	127.703	< 2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 196.6 on 32 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.998, Adjusted R-squared: 0.998

F-statistic: 1.631e+04 on 1 and 32 DF, p-value: < 2.2e-16

ANEXO 4: Cromatograma EE2: Íon de quantificação e íon de confirmação