



REMOÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS POR DISTINTAS
COMUNIDADES MICROBIANAS EM REATOR DE LEITO MÓVEL COM
BIOFILME

Elisângela Edila Schneider

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Márcia Walquíria de Carvalho
Dezotti

Rio de Janeiro
Novembro de 2015

REMOÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS POR DISTINTAS
COMUNIDADES MICROBIANAS EM REATOR DE LEITO MÓVEL COM
BIOFILME

Elisângela Edila Schneider

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof^a. Juacyara Carbonelli Campos, D.Sc.

Prof^a. Daniele Maia Bila, D.Sc.

Prof^a. Rejane Helena Ribeiro da Costa, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
NOVEMBRO DE 2015

Schneider, Elisângela Edila

Remoção de desreguladores endócrinos por distintas comunidades microbianas em reator de leito móvel com biofilme/ Elisângela Edila Schneider. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XXII, 160 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 98-119.

1. Desreguladores endócrinos. 2. Reator de leito móvel com biofilme. 3. Micropoluentes. I. Dezotti, Márcia Walquíria de Carvalho. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

A Deus e em memória do meu querido avô Etel

*“Os sonhos de Deus são maiores que os meus,
Ele vai fazer o melhor por mim,
Ele vai além do que eu posso ver
Ele faz o que eu não posso fazer.*

*Deus vai cumprir os seus planos em mim
Ele vai fazer o que lhe apraz
Sou pequeno e falho, mas Ele é Deus.
Ele só faz o melhor pelos seus.”*

Nani Azevedo

Trecho da música “Os sonhos de Deus”

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pelo direito a vida, por ter iluminado o meu caminho até aqui e por sempre me dar forças para enfrentar todos os desafios que me são impostos.

A todos da minha família, em especial aos meus pais, Romeo e Eleci, que são meus exemplos de vida e meu porto seguro em todos os momentos. Obrigada por compreender o motivo da minha ausência e pelo incentivo em seguir o caminho que eu escolhi. Ao meu querido avô Etel, o qual sempre me orientou com sua frase clássica: “Primeiro os estudos, depois o resto!”, sábias palavras.

Ao meu grande companheiro e marido, Felipe, que tanto me incentivou e ajudou no decorrer desta tese. Você é uma pessoa maravilhosa que Deus colocou na minha vida. Obrigada por tudo meu amor.

À minha família carioca: meu sogro e minha sogra, Paulo e Greicy. Obrigada pelo apoio, pelos maravilhosos almoços de domingo, mas principalmente pelo enorme carinho que recebo de vocês, pessoas tão especiais.

Um especial agradecimento à professora Márcia pela oportunidade de orientação e pelos ensinamentos passados desde o início do mestrado. Obrigada pela compreensão, incentivo e confiança quanto ao desenvolvimento desta tese em tempo parcial.

Às duas empresas nas quais trabalhei ao longo do desenvolvimento desta tese e onde obtive muitos ensinamentos técnicos e para a vida: Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE) e do Centro Brasileiro de Pesquisas da *General Electric*. Aos grandes amigos que fiz nestas empresas e que me muito me incentivaram na conclusão desta tese.

A todos os meus amigos maravilhosos desde a turma de mestrado de 2008: Felipe, Karen, Aldo, Gisele, Guillermo, Lívia; e aos amigos do Laboratório de Controle de Poluição das Águas (LabPol) que tanto me auxiliaram no desenvolvimento desta tese de doutorado. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e pelo auxílio em todas as horas difíceis.

Às amigas do Laboratório de Bioprocessos: Mônica Yumi e Carla pelo aprendizado e auxílio na utilização do cromatógrafo gasoso para as análises dos estrogênios.

Ao PEQ pela possibilidade de ser aluna do programa.

Aos funcionários da secretaria e do prédio Anexo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro nos seis primeiros meses do doutorado.

Aos professores Tito, Juacyara, Daniele e Rejane por terem aceitado o convite para participarem da banca examinadora. Um agradecimento especial ao professor Tito pelos seus questionamentos e ensinamentos repassados nos seminários de acompanhamento.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, e que certamente foram importantes durante o trajeto percorrido.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

REMOÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS POR DISTINTAS
COMUNIDADES MICROBIANAS EM REATOR DE LEITO MÓVEL COM
BIOFILME

Elisângela Edila Schneider

Novembro/2015

Orientadora: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Programa: Engenharia Química

Reatores de leito móvel com biofilme (MBBR) com distintas comunidades microbianas foram utilizados para avaliar o destino do 17β -estradiol (E2) e do 17α -etinilestradiol (EE2), considerando tanto as concentrações na fase aquosa quanto na biomassa. Três sistemas MBBR operaram em paralelo com distintos efluentes sintéticos para o desenvolvimento de culturas ricas em bactérias heterotróficas (MBBR-H), em bactérias autotróficas (MBBR-A) e com ambos os grupos (MBBR-HA). A adição dos estrogênios resultou na produção excessiva de exopolímeros nos três reatores, além da inibição da nitrificação no MBBR-A (com posterior recuperação). A biodegradação foi a principal forma de remoção dos estrogênios. O MBBR-A apresentou as melhores eficiências de remoção do EE2 por biodegradação (69,6 – 71,2%). Com relação ao E2, a biodegradação (87,1 – 93,1%) e a adsorção na biomassa (1,2 – 7,4%) foram similares entre as comunidades microbianas investigadas. A remoção dos estrogênios por adsorção no biofilme correspondeu a valores inferiores a 0,001%, devido ao baixo crescimento da biomassa aderida. Já a adsorção aos sólidos em suspensão se mostrou mais evidente na biomassa heterotrófica (15,5 – 24,9%). A influência do tempo de retenção hidráulica (TRH) entre 8 e 12 h não foi significativa na remoção global dos estrogênios em cada um dos sistemas MBBR.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ENDOCRINE DISRUPTORS REMOVAL BY DIFFERENT MICROBIAL
COMMUNITIES IN MOVING BED BIOFILM REACTOR

Elisângela Edila Schneider

November/2015

Advisor: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Department: Chemical Engineering

Moving bed biofilm reactors (MBBR) with different microbial communities were used to evaluate 17β -estradiol (E2) and 17α -ethinylestradiol (EE2) fate, considering concentrations in aqueous phase and biomass. Three MBBRs systems operated in parallel with different synthetic wastewater for development of enriched cultures of heterotrophic (MBBR-H), autotrophic (MBBR-A) and with both groups (MBBR-HA). Estrogens addition resulted exopolymers overproduction in all MBBR systems, and nitrification inhibition occurred in MBBR-A (with subsequent recuperation). Biodegradation was the main removal pathway. MBBR-A presented better EE2 removal efficiencies by biodegradation (69.6 – 71.2%). E2 biodegradation (87.1 – 93.1%) and sorption (1.2 – 7.4%) were similar among the microbial communities investigated. Biofilm sorption in mass balances represented less than 0.001% in comparison with all estrogens fates, due to the low increment observed in attached biomass. EE2 removal by sorption in suspended biosolids was more evident in heterotrophs biomass (15.5 – 24.9%). No significant influence of hydraulic retention time (HRT) between 8 and 12 h was observed in global estrogens removal of each MBBR system.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS DA TESE.....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1 Desreguladores endócrinos	06
3.1.1 Estrogênios	06
3.2 Mecanismos de ação dos DE	09
3.3 Fontes e destinos dos estrogênios	10
3.4 Efeitos causados pela exposição à desreguladores endócrinos.....	17
3.5 Tipos de tratamento para remoção de desreguladores endócrinos	20
3.6 Adsorção de desreguladores endócrinos no lodo biológico.....	24
3.7 Remoção dos estrogênios por biodegradação	26
3.7.1 Fatores que influenciam na biodegradação dos estrogênios.....	27
3.7.1.1 Características do efluente	27
3.7.1.2 Condições operacionais.....	28
3.7.1.3 Comunidade microbiana	30
3.7.2 Rotas de biodegradação dos estrogênios	35
3.8 Reatores de leito móvel com biofilme	37
3.9 Remoção de estrogênios por sistemas com biomassa fixa	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Sistemas reacionais	42
4.1.1 Hidrodinâmica dos reatores biológicos	44
4.2 Efluentes sintéticos	45
4.3 Estrogênios.....	48
4.4 Metodologia analítica	49
4.4.1 Demanda química de oxigênio	49
4.4.2 Nitrogênio amoniacal.....	50
4.4.3 Nitrato e nitrito	50
4.4.4 Alcalinidade.....	51
4.4.5 Sólidos suspensos totais e voláteis	51
4.4.6 pH e temperatura.....	52
4.4.7 Turbidez.....	52

4.4.8 Biomassa seca aderida	53
4.4.9 Polissacarídeos e proteínas totais.....	53
4.4.10 Microscopia óptica.....	54
4.4.11 Estrogênios	54
4.4.11.1 Concentração e limpeza das amostras	55
4.4.11.2 Cromatografia gasosa	58
4.5 Balanço de massa dos estrogênios	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
5.1 Hidrodinâmica dos reatores biológicos.....	64
5.2 Recuperação dos estrogênios	65
5.3 Cromatografia gasosa	67
5.4 Período de estabilização dos reatores biológicos.....	71
5.5 Alterações nos reatores biológicos após a adição dos estrogênios	73
5.6 Adsorção dos estrogênios na biomassa.....	84
5.7 Balanço de massa dos estrogênios	88
6. CONCLUSÕES	95
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
Anexo A – Curvas de calibração	120
Anexo B – Resultados dos testes hidrodinâmicos	124
Anexo C – Resultados durante o período de estabilização.....	126
Anexo D – Resultados após a adição dos estrogênios.....	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura química dos estrogênios: a) estrona (E1), b) 17 β -estradiol (E2) (com identificações dos carbonos e dos anéis da estrutura padrão de estrogênios) e c) 17 α -etinilestradiol (EE2)	07
Figura 3.2: Sistema endócrino do ser humano (adaptado de U.S.EPA, 2011).....	10
Figura 3.3: Estruturas químicas de alguns estrogênios conjugados: a) E1-3-glucoronídeo, b) E1-3-sulfato, c) E2-3-glucoronídeo, d) E2-3-sulfato e e) E2-17-sulfato (adaptado de RACZ e GOEL, 2010).	13
Figura 3.4: Fontes e destinos de estrogênios no meio ambiente (adaptado de HAMID e ESKICIOGLU, 2012).....	16
Figura 3.5: Janela de sensibilidade do desenvolvimento do ser humano a desreguladores endócrinos (adaptado de WHO, 2012).	20
Figura 3.6: Esquema da biodegradação dos estrogênios via metabolismo (adaptado de TRAN <i>et al.</i> , 2013).....	31
Figura 3.7: Esquema da biodegradação dos estrogênios via cometabolismo (adaptado de TRAN <i>et al.</i> , 2013).....	31
Figura 3.8: Rotas de biodegradação do E2 por bactérias aeróbias: (i) hidroxilação do anel A em C-4, (ii) hidroxilação do anel saturado, (iii) desidratação do anel D em C-17 e (iv) desidrogenação do anel D em C-17 (adaptado de YU <i>et al.</i> , 2013; rotas confirmadas em linhas sólidas e rotas propostas em linhas tracejadas).	35
Figura 3.9: Rotas de biodegradação do EE2 por bactérias e algas: (a) hidroxilação do anel A em C-2 e ruptura do anel A por bactérias nitrificantes; (b) conversão de 3-OH no anel A por algas; (c) hidroxilação do anel B em C-6 por algas; (d) conversão do anel D em C-17 por bactérias heterotróficas; (e) conjugação por algas (adaptado de YU <i>et al.</i> , 2013; rotas confirmadas em linhas sólidas e rotas propostas em linhas tracejadas).	36
Figura 3.10: Esquema operacional do MBBR (a) aeróbio e (b) anóxico/anaeróbio (adaptado de VEOLIA, 2012).	37
Figura 3.11: Suportes da AnoxKaldnes [®] : (a) K1, (b) K3, (c) Biofilm Chip-M e (d) Biofilm Chip-P (VEOLIA, 2012).....	38

Figura 4.1: Representação esquemática do sistema reacional utilizado (os efluentes sintéticos estão detalhados no capítulo 4.2).	42
Figura 4.2: Suporte K1 da AnoxKaldnes®.	43
Figura 4.3: Métodos analíticos para quantificação de estrogênios: a) na fase líquida (baseado em TERNES <i>et al.</i> , 1999a) e b) no biofilme (baseado em TERNES <i>et al.</i> , 2002).	55
Figura 4.4: Procedimento esquemático da EFS: I – condicionamento do cartucho; II – extração; III – secagem do cartucho; IV – eluição; V – secagem da acetona (adaptado de DIAS <i>et al.</i> , 2010).	56
Figura 4.5: Fluxograma das metodologias analíticas utilizadas para avaliar a eficiência do processo de extração em fase sólida para (a) solução aquosa de hormônio e (b) solução de hormônio em acetona.	57
Figura 5.1: Perfil de variação dos tempos de mistura com U_G para os três sistemas MBBR.....	65
Figura 5.2: Curva de calibração do 17β -estradiol (E2)	67
Figura 5.3: Curva de calibração do 17α -etinilestradiol (EE2).....	68
Figura 5.4: Curva de calibração da estrona (E1)	68
Figura 5.5: Cromatograma do BSTFA + 1% TMCS e da piridina.....	69
Figura 5.6: Efeito do efluente sintético autotrófico (a) sem estrogênio e (b) com estrogênio na quantificação dos estrogênios pela metodologia proposta	69
Figura 5.7: Efeito do efluente sintético heterotrófico (a) sem estrogênio e (b) com estrogênio na quantificação dos estrogênios pela metodologia proposta	70
Figura 5.8: Efeito do efluente sintético heterotrófico/autotrófico (a) sem estrogênio e (b) com estrogênio na quantificação dos estrogênios pela metodologia proposta	70
Figura 5.9: Efeito dos estrogênios na nitrificação do MBBR-A	73
Figura 5.10: Perfil de concentração dos íons nitrito e nitrato no MBBR-A.....	74
Figura 5.11: Perfis de concentração de SST dos três sistemas MBBR	75
Figura 5.12: Perfis de concentração de SSV dos três sistemas MBBR.....	75

Figura 5.13: Valores de turbidez dos sobrenadantes dos efluentes dos sistemas MBBR após sedimentação por 10 min.....	76
Figura 5.14: Massa de biofilme aderido aos suportes dos sistemas MBBR (base seca).77	
Figura 5.15: Perfil de concentração de polissacarídeos totais no biofilme dos sistemas MBBR investigados.....	77
Figura 5.16: Perfil de concentração de proteínas totais no biofilme dos sistemas MBBR investigados	78
Figura 5.17: Valores médios da razão PT/PS dos três sistemas MBBR nas condições operacionais investigadas	79
Figura 5.18: Variação da razão PT/PS nos três sistemas MBBR investigados	80
Figura 5.19: Perfis de concentração de DQO _S nos sistemas MBBR-H e MBBR-HA	81
Figura 5.20: Microfotografias com aumento de 10x da biomassa aderida nos sistemas (a) MBBR-A, (b) MBBR-H e (c) MBBR-HA durante (1) o período de estabilização e (2) TRH de 8 h.....	82
Figura 5.21: Influência da comunidade microbiana no destino do 17β-estradiol nos sistemas MBBR	88
Figura 5.22: Influência da comunidade microbiana no destino do 17α-etinilestradiol nos sistemas MBBR	89
Figura 5.23: Concentrações médias nos efluentes e eficiências de remoção de E2 nos três sistemas MBBR	91
Figura 5.24: Concentrações médias nos efluentes e eficiências de remoção de EE2 nos três sistemas MBBR	92
Figura 5.25: Concentrações médias de E1 nos efluentes dos três sistemas MBBR	93
Figura A.1: Curva de calibração para análise de DQO com baixa concentração.....	120
Figura A.2: Curva de calibração para análise de DQO com alta concentração.....	120
Figura A.3: Curva de calibração para análise de nitrogênio amoniacal	121
Figura A.4: Curva de calibração para análise de nitrito	121
Figura A.5: Curva de calibração para análise de nitrato.....	122

Figura A.6: Curva de calibração para análise de polissacarídeos totais.....	122
Figura A.7: Curva de calibração para análise de proteínas totais.....	123
Figura B.1: Variação da condutividade no MBBR-A com o tempo para os testes hidrodinâmicos com U_G de 15,1 m.h ⁻¹ , 18,0 m.h ⁻¹ , 20,9 m.h ⁻¹ e 22,4 m.h ⁻¹	124
Figura B.2: Variação da condutividade no MBBR-H com o tempo para os testes hidrodinâmicos com U_G de 15,8 m.h ⁻¹ , 18,8 m.h ⁻¹ , 21,5 m.h ⁻¹ e 23,3 m.h ⁻¹	124
Figura B.3: Variação da condutividade no MBBR-HA com o tempo para os testes hidrodinâmicos com U_G de 14,9 m.h ⁻¹ , 18,4 m.h ⁻¹ , 21,3 m.h ⁻¹ e 22,8 m.h ⁻¹	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Propriedades físicas dos estrogênios (Fonte: U.S.EPA, 2013).....	08
Tabela 3.2: Excreção diária (μg) <i>per capita</i> de estrogênios por humanos (adaptado de JOHNSON <i>et al.</i> , 2000).....	11
Tabela 3.3: Valores estimados da concentração de estrogênio total excretado por animais (adaptado de HAMID e ESKICIOGLU, 2012).....	12
Tabela 3.4: Concentrações de estrogênios encontradas em esgoto sanitário.	15
Tabela 3.5: Efeitos da exposição de seres humanos a concentrações moderadas de desreguladores endócrinos (adaptado de FILALI-MEKNASSI <i>et al.</i> , 2004).	19
Tabela 3.6: Concentrações de estrogênios adsorvidos em lodo biológico.	25
Tabela 3.7: Características dos suportes da AnoxKaldnes [®] (adaptado de VEOLIA, 2012).....	38
Tabela 4.1: Vazões de ar e velocidades ascensionais de ar utilizadas nos testes de tempo de mistura nos reatores biológicos	45
Tabela 4.2: Composição do efluente sintético para sistema MBBR-A baseado em LIANG <i>et al.</i> (2011) com algumas modificações.....	46
Tabela 4.3: Composição do efluente sintético para sistema MBBR-H baseado em KHUNJAR <i>et al.</i> (2008) com algumas modificações.	47
Tabela 4.4: Composição do efluente sintético para sistema MBBR-HA baseado em KHUNJAR <i>et al.</i> (2008) com algumas modificações.	47
Tabela 4.5: Composição da solução de micronutrientes (baseado em VISHNIAC e SANTER, 1957).	48
Tabela 4.6: Condições de operação do sistema CG/DIC para quantificação simultânea dos estrogênios E1, E2 e EE2.....	60
Tabela 5.1: Valores de tempo de mistura para distintas velocidades ascensionais de ar (U_G), para o reator autotrófico e para o reator heterotrófico	64
Tabela 5.2: Recuperação de estrogênios na EFS das amostras líquidas.....	66

Tabela 5.3: Recuperação de estrogênios nas etapas de extração e de limpeza das amostras sólidas.....	66
Tabela 5.4: Limites de detecção e quantificação dos estrogênios para a metodologia utilizada	70
Tabela 5.5: Resultados dos sistemas MBBR durante o período de estabilização em relação à DQO e N-NH ₄ ⁺	71
Tabela 5.6: Concentrações de E2 e EE2 adsorvidos no biofilme e nos sólidos em suspensão nos sistemas MBBR (n = 2)	84
Tabela C.1: Resultados de DQO solúvel dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.....	126
Tabela C.2: Resultados de nitrogênio amoniacal dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.....	128
Tabela C.3: Resultados de nitrato dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização	130
Tabela C.4: Resultados de nitrito dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização	132
Tabela C.5: Resultados de SST dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização	134
Tabela C.6: Resultados de SSV dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização	135
Tabela C.7: Resultados de turbidez dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização	136
Tabela C.8: Resultados de PS e PT do biofilme dos sistemas MBBR no período de estabilização	137
Tabela C.9: Resultados de biomassa seca aderida dos sistemas MBBR no período de estabilização	137
Tabela C.10: Resultados de pH dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização	138
Tabela C.11: Resultados de temperatura dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.....	140

Tabela D.1: Resultados de DQO solúvel dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	142
Tabela D.2: Resultados de nitrogênio amoniacal dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	144
Tabela D.3: Resultados de nitrato dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	146
Tabela D.4: Resultados de nitrito dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	148
Tabela D.5: Resultados de SST dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	150
Tabela D.6: Resultados de SSV dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	151
Tabela D.7: Resultados de turbidez dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	152
Tabela D.8: Resultados de PS e PT do biofilme dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	153
Tabela D.9: Resultados de biomassa seca aderida dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	153
Tabela D.10: Resultados de pH dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	154
Tabela D.11: Resultados de temperatura dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios	156
Tabela D.12: Concentrações de E2 nos efluentes dos sistemas MBBR	158
Tabela D.13: Concentrações de EE2 nos efluentes dos sistemas MBBR	159
Tabela D.14: Concentrações de E1 nos efluentes dos sistemas MBBR	160

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Δ_{BIO} : diferença entre a biomassa aderida aos suportes plásticos no início e no final do período de operação

ΔG : variação da energia livre de Gibbs

Δt : tempo de operação

A/M: relação alimento/micro-organismos

AMO: enzima amônia monooxigenase

ATU: 1-alil-2-tiouréia

BOA: bactérias que oxidam a amônia

BSTFA: N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CAG: carvão ativado granular

CAP: carvão ativado em pó

CCL: *Contaminant Candidate List*

CEDAE: Companhia Estadual de Águas e Esgotos

$C_{\text{Ei,BIO}}$: concentração de estrogênio adsorvido no biofilme

$C_{\text{Ei,ENT}}$: concentração média de estrogênio no afluente sintético

$C_{\text{Ei,SAÍDA}}$: concentração média de estrogênio no efluente final

$C_{\text{Ei,SST}}$: concentração de estrogênio adsorvido nos sólidos em suspensão

CG: cromatografia gasosa

DE: desregulador endócrino

DES: dietilestilbestrol

DIC: detector por ionização em chama

DP_a : desvio padrão da intersecção com o eixo y de três curvas de calibração de cada estrogênio

DQO: demanda química de oxigênio

DQO₅: demanda química de oxigênio solúvel

E1: estrona

E2: 17 β -estradiol

E3: estriol

EE2: 17 α -etinilestradiol

ECHA: *European Chemicals Agency*

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

EFS: extração em fase sólida

E_i: estrogênio genérico, representado pela letra *i*

EPS: exopolímeros

ETA: estação de tratamento de água

ETE: estação de tratamento de esgoto

IC: inclinação da curva de calibração de cada estrogênio

IFAS: *Integrated Fixed-Film Activated Sludge*

K_{OC}: coeficiente de adsorção

K_{OW}: coeficiente de partição octanol/água

LD: limite de detecção

L_{Ei,ADS}: carga de estrogênios removida por adsorção à biomassa

L_{Ei,BIO}: carga de estrogênios correspondente a biotransformação

L_{Ei,ENT}: carga de estrogênio alimentada ao sistema MBBR

L_{Ei,SAÍDA}: carga de estrogênio que sai do sistema MBBR

LQ: limite de quantificação

MBBR: reator de leito móvel com biofilme

MBBR-A: reator de leito móvel com biofilme enriquecido em bactérias autotróficas

MBBR-H: reator de leito móvel com biofilme enriquecido em bactérias heterotróficas

MBBR-HA: reator de leito móvel com biofilme com bactérias autotróficas e heterotróficas

MF: microfiltração

N-NH₄⁺: nitrogênio na forma de nitrogênio amoniacal

ND: não detectado

NF: nanofiltração

NO₂⁻: íon nitrito

NO₃⁻: íon nitrato

OD: oxigênio dissolvido

OI: osmose inversa

PCB: bifenila policlorada

PMS: produtos microbianos solúveis

POA: processos oxidativos avançados

PS: polissacarídeos totais

PT: proteínas totais

PT/PS: relação entre proteínas totais e polissacarídeos totais

Q: vazão de afluente

Q_G: vazão de ar

R²: coeficiente de correlação

SSF: sólidos suspensos fixos

SST: sólidos suspensos totais

SSV: sólidos suspensos voláteis

TCA: ciclo do ácido tricarbóxico (ou ciclo de Krebs)

t_M: tempo de mistura

TMCS: trimetilclorosilano

TMS: grupo trimetilsilila

TRH: tempo de retenção hidráulica

TRS: tempo de retenção de sólidos

U_G : velocidade ascensional de ar

UF: ultrafiltração

UNT: unidade nefelométrica de turbidez

U.S.EPA: *United States – Environmental Protection Agency*

V_S/V_R : fração de enchimento ou razão de recheio

VTG: vitelogenina

YES: *Yeast Estrogen Screen*

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população e, conseqüentemente, com uma maior produção industrial e agrícola, a demanda de água no Brasil tem aumentado nos últimos anos. Somado a isso, o Brasil vem sofrendo com a crise hídrica na região sudeste, principalmente no último ano, além do já conhecido problema da seca no sertão nordestino e o impacto da redução dos volumes dos reservatórios na produção energética brasileira (ANA, 2015). Por estes motivos, a preservação dos recursos hídricos torna-se essencial para sobrevivência e desenvolvimento do país.

Atrelado à situação atual dos recursos hídricos, o intenso e crescente desenvolvimento de novos compostos sintéticos tem resultado em um número cada vez maior de contaminantes encontrados no meio ambiente, seja em corpos hídricos, solo ou ar (BOLONG *et al.*, 2009; DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2009). Apesar das inúmeras pesquisas realizadas nos últimos anos, ainda se conhece muito pouco sobre as quantidades despejadas, o comportamento, as formas de degradação, os destinos e os efeitos tóxicos de muitos dos compostos sintéticos que foram introduzidos no meio ambiente, oriundos das atividades humanas (GABET-GIRAUD *et al.*, 2010; GUITART e READMAN, 2010; PLÓSZ *et al.*, 2010; SIPMA *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2013).

O progresso na química analítica instrumental e nas técnicas de extração tem permitido a detecção de uma faixa mais ampla de compostos e em concentrações cada vez menores em amostras ambientais, contribuindo para o conhecimento do problema dos micropoluentes (poluentes que estão presentes no meio ambiente em concentrações na ordem de microgramas e nanogramas por litro) (KUSTER *et al.*, 2008; GUITART e READMAN, 2010).

Dentre os compostos classificados como micropoluentes existem os desreguladores endócrinos (DE) que são substâncias exógenas que interferem de diversas formas no sistema endócrino dos organismos. De acordo com CONROY *et al.* (2007), os estrogênios naturais e sintéticos são os desreguladores endócrinos que apresentam maior estrogenicidade. A principal fonte de estrogênios no meio ambiente é o esgoto sanitário (SIM *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2013), devido à presença de estrogênios naturais (estrona, 17β -estradiol, estriol) e sintéticos (17α -etinilestradiol) que são excretados pelos seres humanos diariamente através da urina e fezes.

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) existentes foram projetadas basicamente para a remoção de particulados, substâncias carbonáceas e, no melhor dos

casos, para remoção de nutrientes (AURIOL *et al.*, 2006; BOLONG *et al.*, 2009; LUNDSTRÖM *et al.*, 2010; PLÓSZ *et al.*, 2010; RACZ e GOEL, 2010; SILVA *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b), que normalmente são eficientemente removidos pelas ETES, porém, a remoção dos desreguladores endócrinos ocorre apenas parcialmente.

A maior parte dos desreguladores endócrinos que entra nas ETES é constantemente despejada no meio ambiente devido ao desconhecimento dos mecanismos completos de degradação e das melhores condições operacionais que favoreçam a sua remoção, além da ausência de uma legislação específica (BOLONG *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2014b). A prevenção da contaminação do meio ambiente através da melhoria da eficiência de remoção destes compostos nas ETES deve ser o principal foco das pesquisas, já que inúmeros efeitos adversos em animais têm sido relatados na literatura (ROUTLEDGE *et al.*, 1998; ALTMANN *et al.*, 2012; HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

De acordo com o “Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto” publicado pela Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (SNSA, 2012), no Brasil 48,3% do esgoto gerado é coletado e desses apenas 38,7% é tratado, evidenciando a significativa quantidade de esgoto *in natura* que é descartada continuamente no meio ambiente. Estes percentuais alarmantes geram uma necessidade de desenvolvimento e/ou melhoria de tecnologias de tratamento que sejam eficientes e, principalmente, economicamente viáveis, para aplicações em ETES já existentes no território nacional.

Inúmeros tratamentos têm sido propostos e estudados para avaliar a remoção de desreguladores endócrinos de forma mais efetiva, como por exemplo: adsorção em carvão ativado (WESTERHOFF *et al.*, 2005; SNYDER *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2009a), ozonização (HUBER *et al.*, 2005; WESTERHOFF *et al.*, 2005; AURIOL *et al.*, 2006; BILA *et al.*, 2007; LARCHER *et al.*, 2012; MARGOT *et al.*, 2013), processo Fenton (XU *et al.*, 2013b; LI e ZHANG, 2014), UV solar (FRONTISTIS *et al.*, 2012; KOUTANTOU *et al.*, 2013), oxidação catalítica (BISTAN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012a; HAN *et al.*, 2012) e processos de separação por membranas (KIMURA *et al.*, 2004; NGHIEM *et al.*, 2004; YOON *et al.*, 2004; BOLONG *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012). Entretanto, a maior parte destas tecnologias implica em um aumento considerável do custo operacional para o tratamento do esgoto sanitário, além do custo adicional de instalação de uma nova etapa de tratamento.

Neste contexto, muitos tratamentos biológicos têm sido avaliados na remoção de desreguladores endócrinos, tanto em estudos em escala de laboratório quanto em ETEs, com o intuito de esclarecer as rotas de biodegradação, as melhores condições operacionais e os micro-organismos responsáveis pela remoção destes compostos (TRAN *et al.*, 2013). Estes estudos são realizados, na sua maioria, em sistemas com biomassa em suspensão, sendo pouco avaliado o desempenho dos reatores de biomassa fixa. Na literatura aberta existem poucas pesquisas relacionadas com a remoção de estrogênios utilizando o reator de leito móvel com biofilme (MBBR) como tratamento biológico principal (LUO *et al.*, 2014a; LUO *et al.*, 2015) ou como tratamento terciário (GUNNARSSON *et al.*, 2009; LUNDSTRÖM *et al.*, 2010).

De acordo com alguns estudos da literatura, as bactérias que oxidam a amônia (BOA) podem cometabolizar desreguladores endócrinos como os estrogênios (VADER *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2004; YI e HARPER, 2007; KHUNJAR *et al.*, 2008; DE GUSSEME *et al.*, 2009; SKOTNICKA PITAK *et al.*, 2009). Da mesma forma que outros pesquisadores afirmam que bactérias heterotróficas seriam mais favoráveis a biodegradação destes compostos do que as bactérias autotróficas (SHI *et al.*, 2004; GAULKE *et al.*, 2008; KHUNJAR *et al.*, 2011). Porém, a definição de todas as rotas de biodegradação de forma concisa ainda não foi estabelecida (TRAN *et al.*, 2013).

Na presente tese buscou-se identificar qual ou quais das comunidades microbianas estariam envolvidas na biodegradação dos estrogênios naturais e sintéticos em reator com biomassa fixa, o MBBR. Este tipo de reator apresenta uma vantagem com relação a outros sistemas de biomassa em suspensão devido ao elevado tempo de retenção da biomassa, o que conforme a literatura poderia favorecer a remoção de desreguladores endócrinos (CLARA *et al.*, 2005; TRAN *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014a).

Outra vantagem do sistema MBBR frente a tratamentos com lodo em suspensão é a baixa geração de lodo que posteriormente precisa de um descarte adequado. O processo de estabilização de lodo tradicionalmente utilizado é a digestão anaeróbia. Entretanto, baixas remoções de estrogênios têm sido atingidas em digestores anaeróbios (CHAWLA *et al.*, 2014; LI e ZHANG, 2014), o que levaria a uma propagação da contaminação por DE através da utilização do lodo estabilizado como fertilizante na agricultura (TERNES *et al.*, 1999a; LIU e WONG, 2013; YU *et al.*, 2013). Por este motivo, os processos de tratamento biológico que gerem uma menor quantidade de lodo

a ser descartado, como o MBBR, tornam-se mais atrativos, além de proporcionarem um menor custo de disposição e a prevenção da contaminação do solo.

Resultados contraditórios podem ser observados na literatura quanto à efetividade da adsorção de DE na biomassa como um meio importante na remoção, além da indefinição do local onde ocorreria a biodegradação dos compostos: na fase aquosa ou adsorvidos no lodo (BANIHASHEMI e DROSTE, 2014). Alguns autores observaram que a adsorção de estrogênio no lodo corresponderia a apenas 10% da remoção global (ANDERSEN *et al.*, 2003; JOSS *et al.*, 2004; TERNES *et al.*, 2004; GABET-GIRAUD *et al.*, 2010), enquanto que outros relataram elevadas concentrações de estrogênios adsorvidas (CLARA *et al.*, 2004; HOLBROOK *et al.*, 2004; CIRJA *et al.*, 2008; DE GUSSEME *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2013). Poucas pesquisas têm investigado a concentração de hormônios no lodo, possivelmente devido às dificuldades analíticas para quantificar os estrogênios numa matriz tão complexa quanto a biomassa. Por este motivo, neste trabalho foram quantificadas as concentrações de estrogênios tanto na fase aquosa quanto na biomassa (biofilme e sólidos em suspensão) e, através do balanço de massa, foi possível quantificar a contribuição da biodegradação na remoção global dos estrogênios.

2. OBJETIVOS DA TESE

O objetivo desta tese de doutorado foi avaliar a influência de distintas comunidades microbianas na eficiência de remoção de estrogênios (17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol) através da operação de três reatores de leito móvel com biofilme em paralelo: reator autotrófico (MBBR-A), reator heterotrófico (MBBR-H) e reator heterotrófico/autotrófico (MBBR-HA).

Os objetivos específicos desta tese de doutorado foram:

- Avaliar os efeitos da adição dos estrogênios na operação em estado estacionário dos três sistemas MBBR;
- Acompanhar a eficiência da nitrificação e da remoção de matéria orgânica nos reatores autotrófico, heterotrófico e autotrófico/heterotrófico;
- Investigar o destino dos estrogênios durante o tratamento biológico, através da quantificação na fase líquida e no biofilme (adsorção);
- Quantificar e comparar as eficiências de remoção dos estrogênios estudados para as três comunidades microbianas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Desreguladores endócrinos

De acordo com uma publicação da Organização Mundial da Saúde (OMS), desregulador endócrino (DE) é “uma substância ou mistura exógena que altera funções do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, ou de seus descendentes, ou (sub) populações” (UNEP e WHO, 2013). Na literatura, distintos termos têm sido utilizados para designar desreguladores endócrinos, como por exemplo: perturbadores endócrinos, disruptores endócrinos, interferentes endócrinos e interferentes hormonais (BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007; PÁDUA *et al.*, 2009).

Inúmeras substâncias têm sido classificadas como desreguladores endócrinos, ou apresentam fortes indícios de que sejam capazes de interferir no sistema endócrino dos organismos. Os DE podem ser classificados em alguns grupos como ftalatos, alquilfenóis, organoclorados, bisfenol A, parabenos, hidrocarbonetos poliaromáticos, metais pesados, pesticidas (inseticidas, herbicidas, fungicidas), bifenilas policloradas, dioxinas, furanos, fitoestrogênios, estrogênios naturais e sintéticos (BIRKETT e LESTER, 2003; BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007).

A lista de substâncias que têm sido classificadas como desreguladores endócrinos continua aumentando, conforme dados apresentados por alguns órgãos como U.S.EPA (*United States – Environmental Protection Agency*) (U.S.EPA, 2015), European Commission (European Commission, 2015) e ECHA (*European Chemicals Agency*) (ECHA, 2015); comportamento este, já esperado, devido à elevada complexidade do sistema endócrino (FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004; BOLONG *et al.*, 2009).

3.1.1 Estrogênios

Os estrogênios naturais (estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3)) e sintéticos (17 α -etinilestradiol (EE2)) são hormônios esteroides, cujas moléculas contêm um anel aromático (anel A), dois anéis ciclohexano (anéis B e C) e um anel ciclopentano (anel D) (YU *et al.*, 2013), conforme identificado na Figura 3.1.

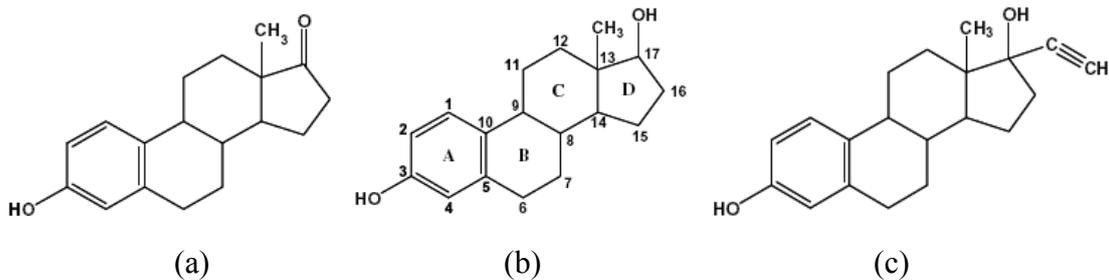


Figura 3.1: Estrutura química dos estrogênios: a) estrona (E1), b) 17 β -estradiol (E2) (com identificações dos carbonos e dos anéis da estrutura padrão de estrogênios) e c) 17 α -etinilestradiol (EE2).

Os hormônios naturais são responsáveis pelo desenvolvimento do sistema reprodutivo feminino nas mulheres, sendo produzidos principalmente pelos ovários e em pequenas quantidades pelas glândulas adrenais (U.S.EPA, 2011). E1, E2 e E3 são produzidos naturalmente por todos dos vertebrados, incluindo os seres humanos (HAN *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013). Os estrogênios sintéticos são utilizados como contraceptivos, em terapia hormonal na menopausa e no tratamento de alguns tipos de câncer (próstata, mama e endométrio) (SBIB, 2015). O 17 α -etinilestradiol é o estrogênio sintético mais comumente utilizado em pílulas anticoncepcionais (YU *et al.*, 2013).

Os estrogênios são os compostos que apresentam os maiores valores de estrogenicidade obtidos pelo ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*), com valores de potência estrogênica relativa ao 17 β -estradiol de 0,2 para estrona, 1,0 para 17 β -estradiol e 1,32 para 17 α -etinilestradiol (CONROY *et al.*, 2007). Por este motivo, os estrogênios naturais e sintéticos podem ser biologicamente ativos em concentrações tão baixas quanto na ordem de nanogramas por litro (ROUTLEDGE *et al.*, 1998; BOLONG *et al.*, 2009). DESBROW *et al.* (1998) sugerem que os estrogênios são os principais responsáveis pela estrogenicidade do esgoto sanitário *in natura* e tratado.

As propriedades físico-químicas dos estrogênios têm um papel importante na predição do destino e comportamento destes compostos, tanto em sistemas de tratamento quanto no meio ambiente (HAMID e ESKICIOGLU, 2012). Na Tabela 3.1 estão detalhadas as principais propriedades dos estrogênios foco desta tese de doutorado.

Tabela 3.1: Propriedades físicas dos estrogênios (Fonte: U.S.EPA, 2013).

Propriedade	Estrogênio		
	Estrona (E1)	17β-estradiol (E2)	17α-etinilestradiol (EE2)
Fórmula química	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Peso molecular (g/mol)	270,37	272,39	296,40
Solubilidade na água (mg/L)	30,0	3,6	11,3
Pressão de vapor (kPa)	3,00 x 10 ⁻⁸	3,00 x 10 ⁻⁸	6,00 x 10 ⁻⁹
Log K _{ow}	3,13 – 3,43	3,94 – 4,01	3,67 – 4,15
Log K _{oc}	3,02 – 4,38	2,90 – 4,01	2,71 – 4,65

A partir dos valores de pressão de vapor da Tabela 3.1 observa-se que os estrogênios são compostos orgânicos com baixa volatilidade (CLOUZOT *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012).

O coeficiente de partição octanol/água (K_{OW}) é definido como a razão entre a concentração de uma substância em octanol e a sua concentração em água. Este coeficiente é um indicador da hidrofobicidade de um composto e pode determinar a sua afinidade pela matéria orgânica (GHISELLI e JARDIM, 2007; CLOUZOT *et al.*, 2008). Conforme Tabela 3.1, os valores de log de K_{OW} para os compostos estrogênicos apresentam-se entre 3,13 e 4,15, sendo classificados com natureza hidrofóbica (SILVA *et al.*, 2012) ou moderadamente hidrofóbica (HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

Os hormônios com valores de log K_{OW} entre 3 e 5 são considerados hidrofóbicos, apresentando uma elevada tendência a acumular no lodo dos sistemas de tratamento (TERNES *et al.*, 2002; DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2009) e uma baixa solubilidade em água (HAMID e ESKICIOGLU, 2012), o que significa que a adsorção deve ser um fator importante na redução destes compostos na fase aquosa (CLOUZOT *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012).

Outro parâmetro relevante é o coeficiente de adsorção (K_{OC}) que define a adsorção de um composto em carbono orgânico. Na ausência de interações iônicas fortes, a adsorção dos compostos depende do conteúdo orgânico no solo e sedimentos (CLOUZOT *et al.*, 2008). A movimentação dos estrogênios nas matrizes ambientais parece ser influenciada pela presença de carbono orgânico na forma coloidal (HOLBROOK *et al.*, 2004). O coeficiente de adsorção tem relação direta com o

coeficiente de partição octanol/água, ou seja, quanto maior a hidrofobicidade de um composto, maior será a sua afinidade pela matéria orgânica.

3.2 Mecanismos de ação dos DE

Em praticamente todos os animais multicelulares, há dois principais sistemas que controlam e coordenam conjuntamente o funcionamento do organismo como um todo: o sistema nervoso e o sistema endócrino (EUROPEAN COMMISSION, 2015).

O sistema endócrino é uma rede complexa presente em inúmeros organismos, como por exemplo, mamíferos, pássaros e peixes, sendo composto por: glândulas endócrinas, hormônios e receptores. O sistema endócrino regula todos os processos biológicos do corpo incluindo o desenvolvimento do cérebro e do sistema nervoso, o crescimento, sistema reprodutivo, metabolismo, níveis de açúcar no sangue, entre outros. As glândulas endócrinas, localizadas em todo o corpo, produzem os hormônios que são lançados na corrente sanguínea ou em outros fluidos extracelulares, atuando como mensageiros químicos. Apesar dos hormônios atingirem todas as partes do corpo, apenas as células alvo com receptores compatíveis são capazes desencadear respostas para regular o funcionamento normal do organismo (BIRKETT e LESTER, 2003; U.S.EPA, 2011; EUROPEAN COMMISSION, 2015). Na Figura 3.2 é possível observar o sistema endócrino no corpo do ser humano.

Os mecanismos pelos quais as substâncias desregulam o funcionamento do sistema endócrino são complexos e ainda não foram totalmente elucidados (FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004). Sabe-se que as alterações ocorrem quando os desreguladores endócrinos interagem de alguma forma com os receptores hormonais, modificando a sua resposta natural.

De acordo com a literatura, alguns mecanismos de ação podem ser atribuídos à capacidade dos DE em (BIRKETT e LESTER, 2003; FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004; BOLONG *et al.*, 2009; PÁDUA, 2009; U.S.EPA, 2011; SILVA *et al.*, 2012):

- a) Mimetizar os efeitos dos hormônios endógenos: pode ocorrer o acoplamento dos DE aos receptores hormonais, induzindo uma resposta similar às células ao imitar a ação de um hormônio específico (efeito agonista);

- b) Bloquear o receptor: o DE pode se acoplar ao receptor hormonal sem produzir nenhuma resposta, apenas bloqueando o acesso do hormônio ao receptor (efeito antagonista);
- c) Desregular hormônios e receptores: os DE podem alterar a síntese, o metabolismo e a regulação dos hormônios e receptores, estimulando ou inibindo a produção de hormônios naturais.

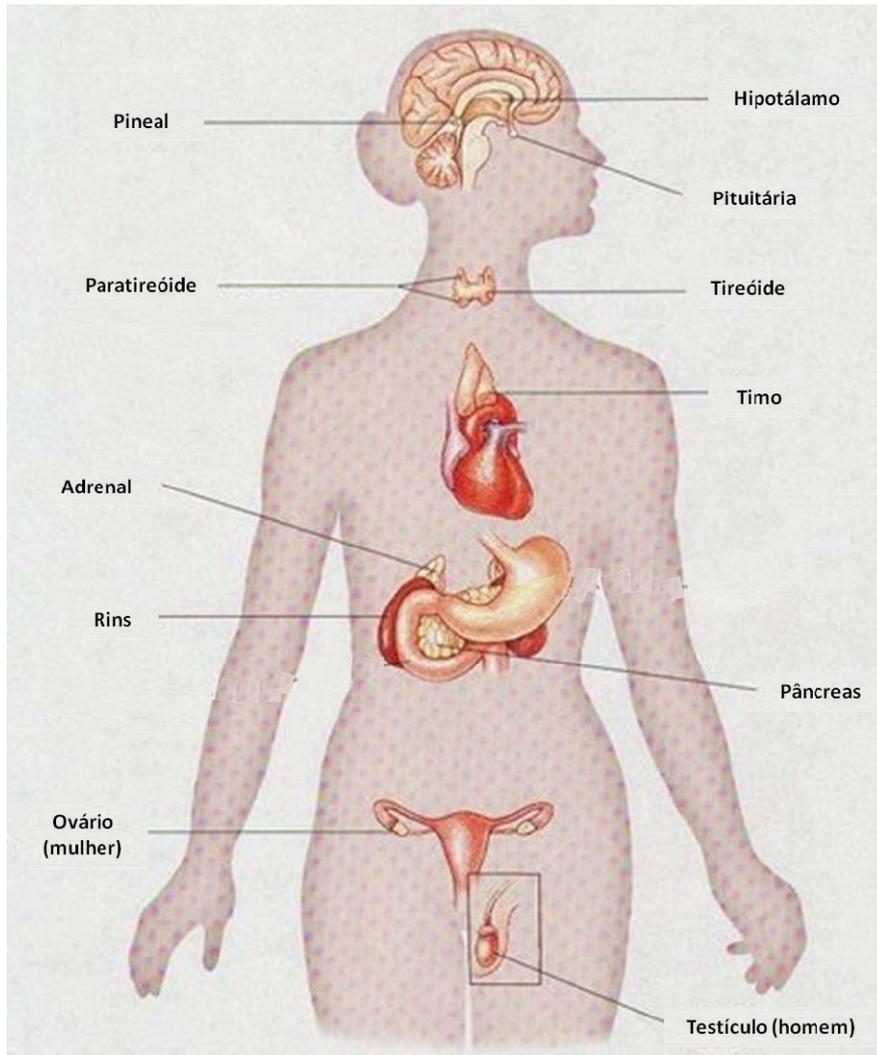


Figura 3.2: Sistema endócrino do ser humano (adaptado de U.S.EPA, 2011).

3.3 Fontes e destinos dos estrogênios

As principais fontes que contribuem para o aporte de estrogênios no meio ambiente são os efluentes da pecuária e o esgoto sanitário *in natura* e tratado (FILALI-

MEKNASSI *et al.*, 2004; KIMURA *et al.*, 2004; NAKADA *et al.*, 2006; CIRJA *et al.*, 2008; SIM *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2013).

De acordo com o estudo realizado por CHANG *et al.* (2009b) sobre os principais contribuintes da contaminação por DE em um rio urbano, sugeriu-se que 62,7% seriam devido a soma dos hormônios presentes em esgoto *in natura*, 29,4% de esgoto sanitário tratado e 7,9% de fonte desconhecida (possivelmente de uma indústria farmacêutica). Em regiões com densidade populacional elevada, os efluentes de ETEs podem representar parcelas significativas da vazão de corpos receptores, principalmente em períodos secos onde ocorrerá um menor efeito de diluição (RACZ e GOEL, 2010). Em todos os casos o aporte de estrogênios através do esgoto sanitário representa uma fonte de contaminação por DE significativa ao meio ambiente.

O ser humano produz estrogênios naturais que são excretados diariamente através da urina e fezes (MARGOT *et al.*, 2013), conforme valores estimados que estão apresentado na Tabela 3.2. Com relação aos estrogênios sintéticos, apenas uma parcela é metabolizada pelo organismo e o restante é eliminado pela urina e/ou fezes (CARBALLA *et al.*, 2004). No caso do EE2, valores maiores que 50% da quantidade ingerida podem ser excretados pelo organismo sem ter sido utilizado (JOHNSON e WILLIAMS, 2004).

Tabela 3.2: Excreção diária (μg) *per capita* de estrogênios por humanos (adaptado de JOHNSON *et al.*, 2000).

Categoria	Excreção diária <i>per capita</i> (μg)		
	E1	E2	EE2
Homens	3,9	1,6	-
Mulheres menstruando	8,0	3,5	-
Mulheres na menopausa	4,0	2,3	-
Mulheres grávidas	600	259	-
Mulheres utilizando anticoncepcional	-	-	35

Assim como os seres humanos, os animais produzem e excretam hormônios que são eliminados através das fezes e urina; problema este que se intensifica em locais destinados para criação de animais confinados (LEE *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013). Hormônios sintéticos são utilizados na criação de animais na prevenção de doenças,

como promotores de crescimento e para o aumento da produtividade (MANICKUM e JOHN, 2014). Na Tabela 3.3 estão apresentadas as concentrações totais de estrogênios excretadas por alguns tipos de animais.

Tabela 3.3: Valores estimados da concentração de estrogênio total excretado por animais (adaptado de HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

Rebanho	Tipo	Concentração total de estrogênio excretado ($\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)	
		Urina	Fezes
Bovino	Bezerro	15	30
	Fêmea	99	200
	Fêmea grávida	320 – 104.320	256 – 7.300
Suíno	Fêmea	82	21
	Fêmea grávida	700 – 17.000	61
Ovino	Fêmea	3	20
	Macho	3	22

Os estrogênios são excretados dos seres humanos pela urina na forma de conjugados dos compostos de origem e em menor quantidade (5 – 10% do total) na forma livre pelas fezes (ADLERCREUTZ e JÄRVENÄÄ, 1982 *apud* MARTI e BATISTA, 2014). Estes compostos conjugados são formados pela adição de grupos glucoronídeos e sulfatos nas posições C3 e/ou C17 dos estrogênios, conforme pode ser observado na Figura 3.3. De acordo com os estudos de TERNES *et al.* (1999b), o 17 β -estradiol foi encontrado quase que exclusivamente na forma E2-3-glucuronídeo, a estrona como E1-3-sulfato e o 17 α -etinilestradiol em ambas as formas conjugadas. Após esta modificação na estrutura química, suas propriedades físico-químicas tornam-se distintas dos estrogênios livres, sendo mais solúveis em água e biologicamente inativos (BIRKETT e LESTER, 2003; FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004; HAMID e ESKICIOGLU, 2012; MARTI e BATISTA, 2014).

Após serem excretados, os hormônios conjugados são transformados novamente em estrogênios livres/ativos pela ação de processos biológicos ao longo dos sistemas de coleta de esgoto e durante o tratamento nas ETEs (TERNES *et al.*, 1999a; TERNES *et al.* 1999b). Esta clivagem ocorre pela ação das enzimas glucuronidase e arilsulfatase,

produzidas por alguns micro-organismos (GOMES *et al.*, 2009 *apud* BANIHASHEMI e DROSTE, 2014). A hidrólise dos conjugados glucuronídeos ocorre devido à alta densidade populacional de bactérias como a *Escherichia coli* no esgoto sanitário, que são capazes de sintetizar a enzima β -glucuronidase (TERNES *et al.*, 1999b; D'ASCENZO *et al.*, 2003).

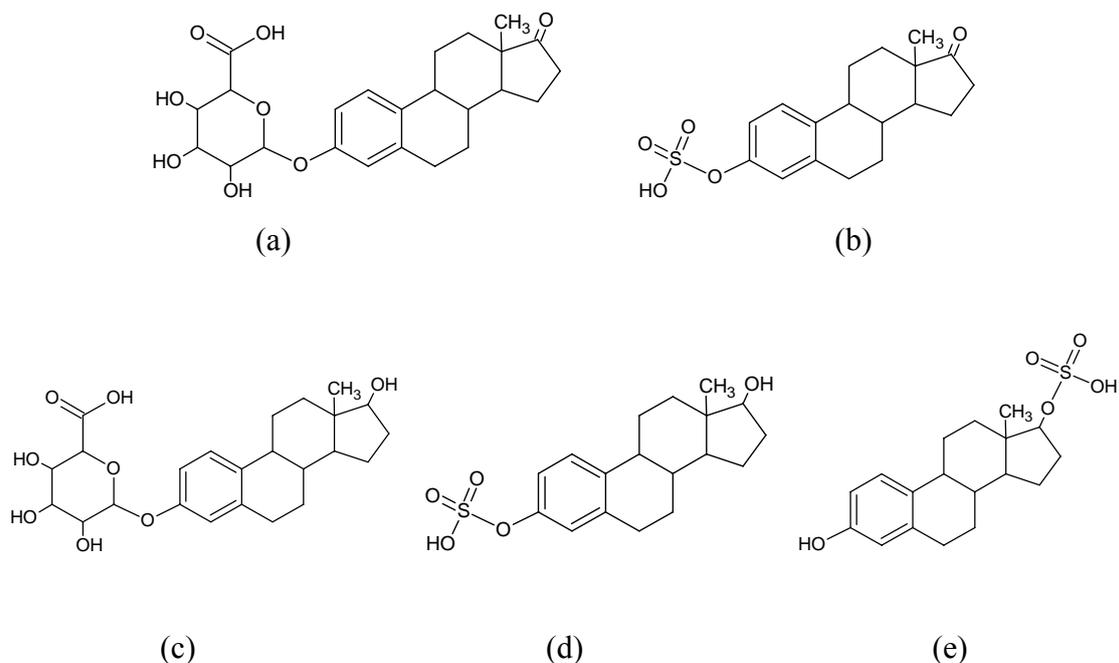


Figura 3.3: Estruturas químicas de alguns estrogênios conjugados: a) E1-3-glucuronídeo, b) E1-3-sulfato, c) E2-3-glucuronídeo, d) E2-3-sulfato e e) E2-17-sulfato (adaptado de RACZ e GOEL, 2010).

Esta transformação dos glucuronídeos inicia-se ainda nos tanques sépticos e nas redes de coleta do esgoto sanitário, diferentemente dos conjugados com sulfato que ocorre mais lentamente (D'ASCENZO *et al.*, 2003). Como a estrona normalmente se encontra na forma conjugada com sulfato (TERNES *et al.*, 1999b), esta lentidão na clivagem de conjugados com sulfato seria um dos motivos pelos quais se observa o aumento da concentração de estrona ao longo dos sistemas de tratamento, além de este composto ser o primeiro subproduto da rota de biodegradação do E2 (TERNES *et al.*, 1999b; SHI *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2007). De acordo com D'ASCENZO *et al.* (2003) os conjugados glucuronídeos são quase que completamente hidrolisados após a passagem por ETEs (84 – 97%), ao contrário dos conjugados com sulfato, como o E1-3-sulfato, cuja conversão observada foi de apenas 61%.

Inúmeros estudos da literatura têm quantificado as concentrações de estrogênios em amostras de esgoto sanitário, cujos valores apresentam uma grande variabilidade a partir dos limites de detecção até 3.180 ng/L, com uma distribuição de concentração normalmente na seguinte ordem $E1 > E2 > EE2$ (RACZ e GOEL, 2010), conforme pode ser observado nos dados da Tabela 3.4. A avaliação da presença de estrogênios em efluentes e resíduos provenientes da pecuária é escassa na literatura. No estudo de SIM *et al.* (2011), avaliou-se a presença de estrogênios no efluente gerado na produção de animais confinados na Coréia, com valores de 0,169 – 8,15 $\mu\text{g E1/L}$, 0,064 – 0,634 $\mu\text{g E2/L}$ e valores de EE2 menores que o limite de detecção.

Os destinos dos estrogênios normalmente são os corpos receptores (águas subterrâneas e superficiais) e/ou o solo, conforme apresentado no fluxograma da Figura 3.4. No caso da utilização de lodo de excesso das ETEs e do próprio esterco como fertilizante, observou-se um longo período para degradação do E2 no solo (12 – 18 meses), conforme estudos de STUMPE e MARSCHNER (2009). Os estrogênios presentes nestes resíduos podem ser carregados pela ação da chuva ou de irrigação e, desta forma, intensificar a contaminação dos corpos receptores.

Estudos prévios têm demonstrado a presença de estrogênios em concentrações a nível traço em águas superficiais principalmente devido à degradação incompleta nas estações de tratamento de efluentes que são posteriormente descartados no meio ambiente, além do efeito de diluição nos corpos receptores (KUSTER *et al.*, 2008; BOLONG *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2013b). A aplicação de excesso de lodo das ETEs como fertilizante é uma forma de disposição deste resíduo comumente utilizada, que introduz nutrientes e matéria orgânica ao solo. Entretanto, um ponto negativo desta prática é a presença de estrogênios e outros micropoluentes adsorvidos no lodo que podem acumular em plantas ou migrar através do solo até águas subterrâneas (MANICKUM e JOHN, 2014; MARTI e BATISTA, 2014). A presença de estrogênios em águas subterrâneas foi comprovada nos Estados Unidos (79 – 230 ng/L) e na França (0,4 – 1,2 ng/L) (LUO *et al.*, 2014b), sendo devida, possivelmente, pela utilização de água de reúso para irrigação e/ou aplicação de lodo como fertilizante, ambos provenientes de ETEs (TERNES *et al.*, 1999a; DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2009; LIU e WONG, 2013; YU *et al.*, 2013).

Destas matrizes aquosas, tanto superficiais quanto subterrâneas, podem ser captadas as águas para abastecimento público. Entretanto, o tratamento convencional das Estações de Tratamento de Água (ETA) não é capaz de destruir totalmente os

estrogênios presentes, resultando no fato de que a água potável acaba sendo a principal fonte de contaminação dos seres humanos (BIRKETT e LESTER, 2003).

Tabela 3.4: Concentrações de estrogênios encontradas em esgoto sanitário.

País	Concentração média e desvio padrão (mínimo – máximo) (ng/L)			Fonte
	E1	E2	EE2	
África do Sul	84 ± 97 (-)	119 ± 83 (-)	30 ± 29 (-)	MANICKUM e JOHN, 2014
Brasil	566 ± 125 (<LD – 3050)	143 ± 139 (<LD – 776)	421 ± 166 (<LD – 3180)	PESSOA <i>et al.</i> , 2014
	870 ± 40 (-)	1.330 ± 70 (-)	840 ± 50 (-)	FROEHNER <i>et al.</i> , 2011
	890 ± 50 (-)	2.270 ± 120 (-)	1.260 ± 90 (-)	
	1.380 ± 70 (-)	1.450 ± 70 (-)	600 ± 30 (-)	
	40 (-)	21 (-)	5 (-)	TERNES <i>et al.</i> , 1999a
Canadá	Máx. 104	Máx. 66,9	Máx. 5,7	ATKINSON <i>et al.</i> , 2012
	20 ± 3,1 (-)	30 ± 3,0 (-)	*ND	SARAVANABHAVAN <i>et al.</i> , 2009
	49 (19 – 78)	15,6 (2,4 – 26)	-	SERVOS <i>et al.</i> , 2005
Coréia	- (13 – 52)	17 (-)	*ND	SIM <i>et al.</i> , 2011
França	71,2 (18,8 – 170)	20,4 (5,1 – 37,9)	*ND	GABET-GIRAUD <i>et al.</i> , 2010
Japão	- (28,7 – 197)	- (13,3- 25,8)	-	NAKADA <i>et al.</i> , 2006

*ND: não detectado.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos divulgou em 2015 um rascunho da quarta lista de contaminantes (*Contaminant Candidate List 4 - CCL*) onde estão incluídos os seguintes estrogênios: estrona, 17β-estradiol, estriol e 17α-etinilestradiol. A CCL é uma lista de contaminantes que atualmente não fazem parte do escopo de nenhuma legislação, tanto proposta quanto promulgada, para água potável

dos Estados Unidos, mas que já foram detectados em sistemas de tratamento de água (U.S.EPA, 2015).

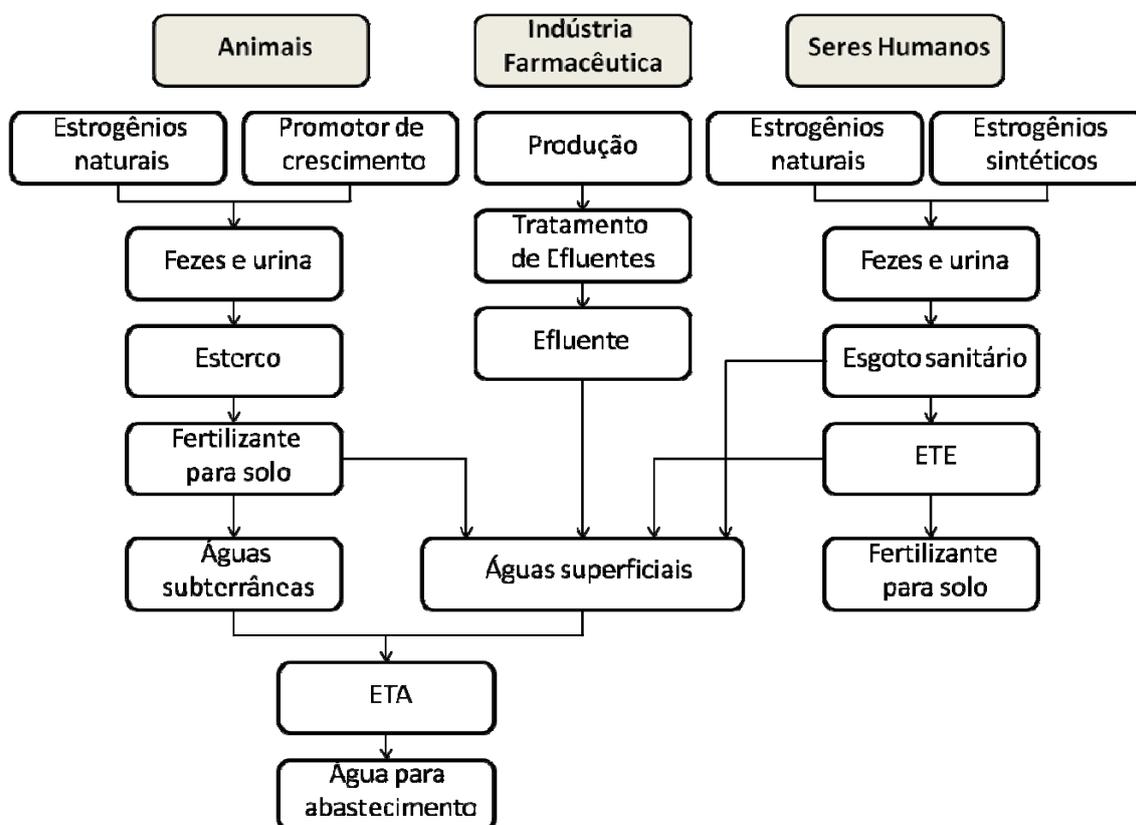


Figura 3.4: Fontes e destinos de estrogênios no meio ambiente (adaptado de HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

A União Europeia propôs a inclusão de estrogênios em uma lista de químicos perigosos prioritários sugerindo padrões de qualidade para a legislação de $3,0 \text{ ng.L}^{-1}$, $0,4 \text{ ng.L}^{-1}$ e $0,035 \text{ ng.L}^{-1}$ para E1, E2 e EE2, respectivamente (EUROPEAN COMMISSION, 2015). Entretanto, até o momento não existe nenhuma legislação no Brasil e em outros países com concentrações máximas permitidas destes estrogênios para descarte de efluentes, utilização de lodo ou como padrão de potabilidade (DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2009; MANICKUM e JOHN, 2014; MARTI e BATISTA, 2014).

3.4 Efeitos causados pela exposição à desreguladores endócrinos

Conforme apresentado no capítulo 3.1, diversas substâncias químicas podem interferir no sistema endócrino de animais e do ser humano. Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm sido publicados na literatura com evidências dos efeitos em animais (moluscos, crustáceos, peixes, répteis, pássaros, mamíferos) causados pelos desreguladores endócrinos, tanto em testes de laboratório como no seu habitat natural (BIRKETT e LESTER, 2003; FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004; NGHIEM *et al.*, 2004; U.S.EPA, 2011).

Compostos estrogênicos com concentrações na ordem de 0,1 a 1,0 ng.L⁻¹ são capazes de induzir respostas biológicas em organismos aquáticos, principalmente na reprodução, desenvolvimento e crescimento destes organismos (ROUTLEDGE *et al.*, 1998; ALTMANN *et al.*, 2012). De acordo com as revisões bibliográficas publicadas por BILA e DEZOTTI (2007) e HAMID e ESKICIOGLU (2012), alguns efeitos foram observados em animais pela ação de DEs, isoladamente ou presentes em efluentes e corpos receptores, como por exemplo, indução da síntese de vitelogenina (VTG) no plasma sanguíneo, feminização de peixes, hermafroditismo, alteração nas gônadas, declínio na reprodução e mudanças de comportamento no acasalamento.

O efeito da exposição à desreguladores endócrinos em plantas tem sido pouco investigado na literatura em comparação ao efeito em animais. A presença dos estrogênios E1 e E2 influenciaram no crescimento, na morfologia e na floração de mudas de girassol e batata (JANECZKO e SKOCZOWSKI, 2005; BROWN, 2006 *apud* HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

Apesar das inúmeras evidências sobre os efeitos dos desreguladores endócrinos em animais, os efeitos adversos destes compostos à saúde dos seres humanos são pouco compreendidos e, algumas vezes, controversos cientificamente (U.S.EPA, 2011; HAMID e ESKICIOGLU, 2012). Nas revisões publicadas por BOLONG *et al.* (2009) e MANICKUM e JOHN (2014) observa-se que alguns autores sugerem vínculos entre DEs e efeitos nos seres humanos, incluindo diminuição da qualidade/quantidade de esperma, aumento do risco de câncer (testículo, próstata, ovários e mama), defeitos no sistema reprodutivo feminino (ovários policísticos, endometriose) e disfunção da tireoide.

Existem poucas evidências dos efeitos de desreguladores endócrinos nos seres humanos, exceto nos casos em que houve uma exposição acidental a estes compostos

(acidentes industriais, contaminação de alimentos ou ingestão inadequada de medicamentos) como os exemplos descritos na Tabela 3.5 (FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004). Um dos exemplos apresentados é o caso em que dietilestilbestrol foi prescrito para mulheres grávidas com o intuito de evitar o aborto espontâneo, o que resultou em efeitos nos seus descendentes. As filhas destas mulheres apresentaram esterilidade e câncer vaginal e nos filhos observaram-se anomalias em órgãos sexuais, contagem média de espermatozoides diminuída e risco de câncer nos testículos (BIRKETT e LESTER, 2003; U.S.EPA, 2011).

A exposição de organismos adultos a desreguladores endócrinos pode resultar nos efeitos detalhados anteriormente apenas em dosagens elevadas, cujos efeitos geralmente desaparecem após a interrupção da exposição aos compostos. Entretanto, sugere-se que pequenas dosagens de desreguladores endócrinos sejam suficientes para afetar o desenvolvimento de fetos e recém-nascidos, com possibilidade de alterações permanentes nestes organismos (COLBORN *et al.*, 1993; BOLONG *et al.*, 2009).

A Organização Mundial da Saúde publicou em 2012 um documento sobre desreguladores endócrinos com a janela de sensibilidade do desenvolvimento do ser humano, apresentada na Figura 3.5 (WHO, 2012). Nesta figura estão detalhados os períodos em que cada órgão/sistema é formado e/ou modificado ao longo do desenvolvimento do ser humano e que estaria suscetível aos efeitos dos DEs. É importante ressaltar que em alguns casos a janela de sensibilidade se estende até o nascimento, infância ou mesmo períodos após a puberdade.

Neste contexto, investigações sistemáticas devem ser conduzidas para obter um maior entendimento dos efeitos dos DEs em animais, plantas e na saúde humana, principalmente no que diz respeito a efeitos de longo prazo de exposição. Entretanto, cabe ressaltar a existência de dificuldades intrínsecas na avaliação de efeitos dos DEs, principalmente em seres humanos.

Tabela 3.5: Efeitos da exposição de seres humanos a concentrações moderadas de desreguladores endócrinos (adaptado de FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004).

Desregulador Endócrino	Efeito
Dietilestilbestrol (DES)	Exposição durante o período pré-natal causa em mulheres: câncer vaginal, deformidades no útero, infertilidade e em homens: baixa produção de esperma, hipospadia e criptorquidia.
Kepone	Exposição ocupacional em homens causa azospermia e infertilidade.
Dioxina	Exposição de adultos conduz a cloracne, aumenta o risco de doença cardiovascular; aumenta o risco de câncer na tireoide, leucemia; exposição em fetos leva ao aborto espontâneo, defeitos de nascença, crescimento reduzido dos dentes.
PCB e dibenzofuranos	Exposição de adultos leva a mudanças na tireoide, lesões na pele; exposição em fetos conduz a deficiências no desenvolvimento neural, imunodeficiências, problemas auditivos, alterações nos órgãos genitais.
Consumo de peixes contaminados (PCBs, metais pesados)	Em mulheres: ciclos menstruais menores; nos seus descendentes: deficiências cognitivas, retardamento no desenvolvimento neural, nascimento de crianças com tamanhos menores.

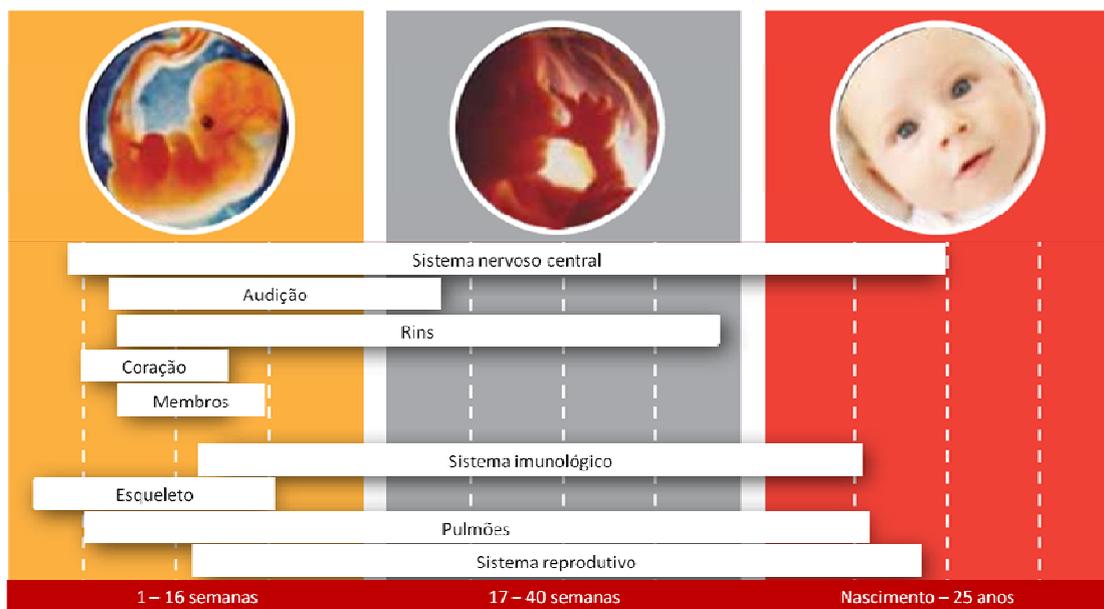


Figura 3.5: Janela de sensibilidade do desenvolvimento do ser humano a desreguladores endócrinos (adaptado de WHO, 2012).

3.5 Tipos de tratamento para remoção de desreguladores endócrinos

Conforme descrito previamente no capítulo 3.3, o destino dos desreguladores endócrinos depende de inúmeros fatores: (a) características intrínsecas dos desreguladores endócrinos, como hidrofobicidade, biodegradabilidade, solubilidade, volatilidade, entre outros, (b) características do efluente (composição, pH, entre outros) e (c) etapas existentes no sistema de tratamento de efluentes e suas condições operacionais (LUO *et al.*, 2014b).

A maioria das Estações de Tratamento de Esgoto existentes não foi projetada para remoção de desreguladores endócrinos, resultando em baixas eficiências de remoção (AURIOL *et al.*, 2006; BOLONG *et al.*, 2009; LUNDSTRÖM *et al.*, 2010; PLÓSZ *et al.*, 2010; RACZ e GOEL, 2010; SILVA *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b). Os principais mecanismos envolvidos na remoção dos estrogênios nas ETES englobam:

- **Adsorção:** A adsorção dos estrogênios pode ocorrer em partículas presentes no efluente (sólidos coloidais e em suspensão, sedimentos, óleos & graxas, microorganismos) ou adicionadas durante o tratamento (biomassa do tratamento

biológico, carvão ativado, coagulantes), sendo um mecanismo importante na remoção destes compostos do esgoto sanitário (FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004). Entretanto, é importante ressaltar que na adsorção não ocorre a mineralização dos compostos, apenas a sua transferência de fase.

- *Degradação biótica e/ou abiótica*: A degradação dos estrogênios normalmente ocorre na etapa de tratamento biológico, principalmente de forma biótica, tanto em sistemas aeróbios quanto em anaeróbios.

Tratamento Primário

Durante o tratamento primário de ETEs a remoção dos estrogênios pode ocorrer por adsorção/sedimentação, entretanto, baixas eficiências de remoção têm sido observadas, normalmente nulas ou até mesmo negativas (CARBALLA *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2005; SERVOS *et al.*, 2005; GABET-GIRAUD *et al.*, 2010). O aumento da concentração dos estrogênios ao longo do tratamento primário foi observado com a estrona em alguns estudos (CARBALLA *et al.*, 2004), comportamento este que pode ser explicado pela lentidão na clivagem da forma conjugada da estrona com sulfato (D'ASCENZO *et al.*, 2003). Os hormônios também podem se associar aos óleos & graxas presentes no esgoto sanitário, sendo removidos por flotação (CARBALLA *et al.*, 2004; AURIOL *et al.*, 2006; KOH *et al.*, 2008; HAMID e ESKICIOGLU, 2012).

Uma pequena melhora na remoção pode ser observada nos casos em que uma etapa de coagulação/floculação é inserida antes do processo de sedimentação. O processo de coagulação com sais de ferro ou alumínio apresentou eficiências de remoção menores que 5% (WESTERHOFF *et al.*, 2005; AURIOL *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2009a) e menores que 35% quando associado a adição de polímero (GABET-GIRAUD *et al.*, 2010).

Tratamento Biológico

Nas ETEs existentes, o tratamento biológico é a etapa que apresenta maior eficiência de remoção de estrogênios, tanto por adsorção na biomassa quanto por biodegradação (MARTI e BATISTA, 2014). Um maior detalhamento dos mecanismos de adsorção e biodegradação dos estrogênios durante o tratamento biológico será apresentado nos capítulos 3.6 e 3.7, respectivamente.

A utilização de enzimas como lacase e manganês peroxidase tem sido estudada por alguns autores na remoção de estrogênios em amostras sintéticas com bons resultados (eficiências de remoção > 95%) (SUZUKI *et al.*, 2003; LLORET *et al.*, 2012). A ação enzimática da lacase na remoção de estrogênios não foi afetada pela sua utilização em efluentes municipais no estudo de AURIOL *et al.* (2007), sendo uma opção para melhoria do tratamento biológico que deve ser melhor investigada.

Tratamento Terciário

Com o intuito de aperfeiçoar a remoção de micropoluentes nas ETEs, tem-se avaliado diversos tratamentos para polimento do esgoto tratado. A adição da maioria destas tecnologias às ETEs melhora significativamente a eficiência de remoção dos estrogênios. Entretanto, algumas desvantagens estão atreladas ao seu uso, como alto custo, aumento do consumo energético e produção de subprodutos tóxicos, sendo pouco utilizadas em tratamento de esgoto em escala industrial (KOH *et al.*, 2008; DE GUSSEME *et al.*, 2009; LLORET *et al.*, 2012).

A adsorção em carvão ativado em pó (CAP) ou granular (CAG) pode ser utilizada para remoção de estrogênios atingindo elevadas remoções em testes com amostras sintéticas limpas (WESTERHOFF *et al.*, 2005; SNYDER *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2009a). Entretanto, no tratamento de efluentes reais pode ocorrer a competição por adsorção nos sítios ativos com outros compostos presentes, com consequente redução das eficiências de remoção (RACZ e GOEL, 2010; SILVA *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2014b). As desvantagens intrínsecas do processo são: (a) reposição constante na utilização de CAP, (b) regeneração das colunas de CAG (aumento do consumo

energético) e (c) transferência de fase dos estrogênios sem a sua destruição (KOH *et al.*, 2008).

As membranas de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) removem apenas estrogênios que estejam associados com partículas coloidais ou em suspensão, devido ao fato que as moléculas dos estrogênios são menores que o diâmetro do poro destas membranas (AURIOL *et al.*, 2006; KOH *et al.*, 2008; RACZ e GOEL, 2010; LUO *et al.*, 2014b). Nestes casos, observam-se rejeições baixas, menores que 40% (YOON *et al.*, 2004; YOON *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2012), que podem ser melhoradas pelo acoplamento com tratamento biológico nos biorreatores com membranas (CHANG *et al.*, 2009a; DE GUSSEME *et al.*, 2009). Por outro lado, as membranas de nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI) apresentam elevadas rejeições dos estrogênios (KIMURA *et al.*, 2004; NGHIEM *et al.*, 2004; YOON *et al.*, 2004; BOLONG *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012). As desvantagens da utilização de membranas para remoção de estrogênios são: (a) geração do rejeito concentrado que precisa ser destinado corretamente; (b) custo da implantação/substituição das membranas de NF e OI; (c) problemas com incrustações e (d) elevado consumo de energia (AURIOL *et al.*, 2006; KOH *et al.*, 2008; RACZ e GOEL, 2010).

Muitos estudos têm sido publicados a respeito da utilização de Processos Oxidativos Avançados (POA) com ótimas eficiências de remoção de estrogênios: ozonização (HUBER *et al.*, 2005; WESTERHOFF *et al.*, 2005; AURIOL *et al.*, 2006; BILA *et al.*, 2007; LARCHER *et al.*, 2012; MARGOT *et al.*, 2013), Fenton (XU *et al.*, 2013b; LI e ZHANG, 2014), radiação ultravioleta solar (FRONTISTIS *et al.*, 2012; KOUTANTOU *et al.*, 2013), oxidação catalítica (BISTAN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012a; HAN *et al.*, 2012) e as suas combinações (GERRITY *et al.*, 2011).

A principal preocupação na utilização de POAs no tratamento de efluentes com estrogênios é a oxidação parcial dos compostos com possibilidade de formação de subprodutos que possuam estrogenicidade similar ou maior aos compostos de origem (BILA *et al.*, 2007; LARCHER *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2014b). De acordo com CHEN *et al.* (2012a), é importante evitar a oxidação parcial através da utilização de dosagens/tempo de contato maiores. Apesar dos POAs apresentarem boas eficiências de remoção, a sua utilização é restrita a sistemas de tratamento de água, devido ao seu alto custo de instalação e/ou operação.

A remoção de estrogênios por cloração durante o tratamento de água tem sido investigada resultando em remoções parciais dos compostos (WESTERHOFF *et al.*, 2005; AURIOL *et al.*, 2006). Apesar de a cloração ser um tratamento de menor custo em comparação aos POAs, há a possibilidade de formação de subprodutos clorados não desejáveis (KOH *et al.*, 2008).

3.6 Adsorção de desreguladores endócrinos no lodo biológico

Conforme apresentado anteriormente no capítulo 3.1.1, os estrogênios apresentam uma tendência à adsorção em lodo biológico pela sua natureza hidrofóbica (SILVA *et al.*, 2012) ou moderadamente hidrofóbica (HAMID e ESKICIOGLU, 2012), observada pelos coeficientes de partição octanol/água (K_{ow}).

A adsorção dos estrogênios é um processo exotérmico (a concentração de equilíbrio da adsorção diminui com o aumento da temperatura) e rápido, atingindo o equilíbrio entre 10 min e 1 h (REN *et al.*, 2007; YI e HARPER, 2007; FENG *et al.*, 2010). Através de estudos termodinâmicos observou-se que adsorção é espontânea ($\Delta G = -15,18$ a $-16,35$ kJ.mol⁻¹ para EE2) e há a predominância da adsorção física sobre a química, devido às baixas energias de ligação dos estrogênios (FENG *et al.*, 2010). A afinidade de adsorção em lodo biológico observada entre os estrogênios geralmente segue a ordem decrescente de EE2 > E1 > E2 (REN *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos da literatura que avaliam a presença/remoção de estrogênios em ETEs e amostras ambientais, não quantifica diretamente a concentração dos compostos na fase sólida (lodo biológico, sedimento, etc.), apenas na fase aquosa. Este problema ocorre possivelmente devido às dificuldades analíticas na quantificação de estrogênios em amostras sólidas, onde são necessárias algumas etapas adicionais de limpeza.

Na literatura não existe um consenso a respeito de a adsorção corresponder ou não a uma parcela significativa da remoção de estrogênios em ETEs. Em alguns estudos, observou-se que a remoção dos estrogênios por adsorção é significativa (CLARA *et al.*, 2004; HOLBROOK *et al.*, 2004; CIRJA *et al.*, 2008; DE GUSSEME *et al.*, 2009),

atingindo 40 a 50% do estrogênio removido no estudo de SHI *et al.* (2013). Porém, outros autores contabilizam que a remoção dos estrogênios por adsorção tipicamente não atinge 10% (ANDERSEN *et al.*, 2003; JOSS *et al.*, 2004; TERNES *et al.*, 2004; GABET-GIRAUD *et al.*, 2010). Em um sistema de lodo ativado estimou-se que 50 a 75% dos estrogênios presentes adsorveram nos flocos em suspensão no tanque de aeração, porém menos de 2% dos estrogênios presentes na alimentação foram removidos juntamente com o excesso de lodo (ANDERSEN *et al.*, 2005). Na Tabela 3.6 estão apresentados alguns casos em que as concentrações dos estrogênios foram quantificadas em amostras de lodo biológico.

Tabela 3.6: Concentrações de estrogênios adsorvidos em lodo biológico.

Concentração ($\mu\text{g.kg}^{-1}$, peso seco)			Fonte
E1	E2	EE2	
$6,8 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	CHEN <i>et al.</i> (2012b)
-	-	$1,1 \times 10^6 - 2,4 \times 10^6$	FENG <i>et al.</i> , 2010
3,16 – 351	17,6 – 202	-	SIM <i>et al.</i> , 2011
< 2 – 3,7	5 – 49	< 2 – 17	TERNES <i>et al.</i> , 2002

Esta variabilidade nos resultados de adsorção dos estrogênios na literatura pode ser atribuída às características de cada efluente (pH, temperatura, quantidade de matéria orgânica), do tipo de tratamento biológico e das condições operacionais de cada sistema (CLARA *et al.*, 2004; STASINAKIS, 2012). O efeito da variação do pH do efluente na adsorção de EE2 em lodo ativado foi avaliado por FENG *et al.* (2010), onde conclui-se que entre pH de 2,0 e 6,0 não houveram diferenças na concentração de equilíbrio atingida; diferentemente de valores de pH maiores que 6,0 onde a concentração diminuiu.

Na investigação de PETRIE *et al.* (2014a) a adsorção dos estrogênios E2 e EE2 foi influenciada pelo TRS, porém o incremento na adsorção não resultou em aumento de biodegradação dos compostos. BANIHASHEMI e DROSTE (2014) também avaliaram o efeito do TRS na adsorção do EE2 em um sistema de lodo ativado e concluíram que as maiores constantes de adsorção foram obtidas com TRS de 10 dias.

Isto pode ocorrer devido às mudanças morfológicas da biomassa em reatores operando com distintos TRS. Desta forma, a quantidade adsorvida também depende das características do lodo biológico como tamanho dos flocos em suspensão, rugosidade, área disponível para adsorção e da composição de exopolímeros que pode ser afetada pelas condições operacionais e características do efluente (AURIOL *et al.*, 2006; BANIHASHEMI e DROSTE, 2014).

As concentrações de estrogênios encontradas em lodo biológico remetem a uma preocupação com a utilização do excesso de lodo das ETEs como fertilizantes na agricultura. Conforme mencionado no capítulo 3.3, os estrogênios presentes no lodo podem atingir corpos receptores (águas superficiais e subterrâneas) resultando na sua contaminação (MANICKUM e JOHN, 2014; MARTI e BATISTA, 2014).

3.7 Remoção dos estrogênios por biodegradação

A biodegradação de estrogênios é considerada a principal etapa de remoção dos estrogênios nas ETEs, onde as maiores eficiências de remoção são observadas (ANDERSEN *et al.*, 2003; TRAN *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b). Entretanto, distintas eficiências de remoção têm sido observadas nos tratamentos biológicos investigados na literatura, possivelmente devido a alguns aspectos: a) tipo de tratamento biológico, (b) características do esgoto sanitário *in natura* (capítulo 3.7.1.1), (c) condições operacionais do sistema (capítulo 3.7.1.2), (d) características da comunidade microbiana (capítulo 3.7.1.3) e (e) metodologias de amostragem e de análise das amostras.

Um ponto que ainda não foi completamente esclarecido é a respeito do local onde a biodegradação ocorre: (a) na superfície do floco (ou biofilme), (b) no interior do floco (ou biofilme) ou (c) no meio reacional através de enzimas extracelulares (JOSS *et al.*, 2004; BAGNALL *et al.*, 2012). De maneira geral, o que se observa é a rápida adsorção dos estrogênios ao lodo biológico, com posterior redução das suas concentrações tanto na fase líquida quanto na fase sólida (URASE e KIKUTA, 2005; REN *et al.*, 2007; HASHIMOTO e MURAKAMI, 2009; ZENG *et al.*, 2009; MARTI e BATISTA, 2014).

O tratamento biológico normalmente faz parte do projeto convencional de ETEs e por este motivo, torna-se mais econômico e sustentável aperfeiçoar a remoção dos estrogênios nesta etapa, ao invés de inserir novos tratamentos terciários ao sistema (JONES *et al.*, 2007). A seguir estão detalhados alguns fatores que podem influenciar a remoção dos estrogênios por biodegradação.

3.7.1 Fatores que influenciam na biodegradação dos estrogênios

Assim como para a adsorção dos estrogênios, observa-se comportamento similar na sua biodegradação, com ampla variabilidade na eficiência de remoção destes compostos entre distintos sistemas de tratamento biológico. Apesar de nem todos os fatores que influenciam a biodegradação terem sido completamente elucidados até o momento, alguns estudos da literatura têm sugerido que as condições operacionais dos sistemas biológicos e as características da comunidade microbiana envolvida seriam os fatores com maior efeito na eficiência de remoção de estrogênios em ETEs.

Na busca pelo entendimento dos fatores que influenciam a remoção dos estrogênios, bem como os mecanismos pelos quais isto ocorre, torna-se possível elencar modificações nas ETEs existentes para potencializar a remoção destes compostos. Alguns destes fatores investigados na literatura estão detalhados a seguir.

3.7.1.1 Características do efluente

A temperatura e o pH podem afetar a atividade microbiana, pois cada micro-organismo possui uma faixa adequada para seu crescimento, além do efeito destes parâmetros sobre a atividade de enzimas (TERNES *et al.*, 1999a; TRAN *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b).

Uma redução na temperatura pode resultar em uma diminuição na eficiência do tratamento como um todo, devido à redução no metabolismo dos micro-organismos presentes. Entretanto, o efeito da temperatura não foi tão efetivo nas investigações de

GABET-GIRAUD *et al.* (2010), onde nenhuma alteração na eficiência de remoção de E1 e E2 foi observada entre as temperaturas de 10 e 20 °C. O mesmo ocorreu na remoção de estrogênios em 17 ETEs em escala industrial, onde não houve correlação linear entre a temperatura do efluente e a eficiência de remoção ($R^2 = 0,005$) (JOHNSON *et al.*, 2005). MANICKUM e JOHN (2014) não observaram correlação entre a temperatura (12 – 24 °C) e a remoção de estrogênios em um sistema de lodo ativado de ETE. O efeito da temperatura foi observado por LI *et al.* (2005) em sistema de lodo ativado em escala de bancada. Neste estudo quanto maior a temperatura (5, 20 e 35 °C) maior a constante da taxa de degradação de E2.

Baixos valores de pH podem desfavorecer o desenvolvimento de bactérias e, em contrapartida, favorecer o crescimento de fungos no sistema, diminuindo assim a remoção de estrogênios do sistema de tratamento (BOTHE *et al.*, 2000 *apud* TRAN *et al.*, 2013).

3.7.1.2 Condições operacionais

Relação Alimento/Micro-organismos (A/M)

Nos sistemas de lodo ativado utiliza-se o parâmetro operacional A/M que relaciona a quantidade de alimento disponível com a quantidade de micro-organismos presentes. Em sistemas que operam com uma relação A/M alta (1 – 5), os micro-organismos preferem degradar compostos mais facilmente biodegradáveis ao invés de compostos como os estrogênios. Desta forma, na operação de sistemas com aplicação de baixos valores de A/M ($< 0,15$) os micro-organismos podem ser forçados a biodegradar os estrogênios e assim, aumentar suas eficiências de remoção (URASE e KIKUTA, 2005; KOH *et al.*, 2008).

Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) e Tempo de Retenção de Sólidos (TRS)

A literatura tem apresentado diversas investigações sobre a influência do tempo de retenção hidráulica (TRH) e principalmente do tempo de retenção de sólidos (TRS) na remoção de compostos estrogênicos em tratamentos biológicos. Quanto maiores os valores de TRS e TRH melhores eficiências de remoção têm sido observadas (TERNES *et al.*, 1999a; ANDERSEN *et al.*, 2003; JOSS *et al.*, 2004; SERVOS *et al.*, 2005; HASHIMOTO e MURAKAMI, 2009; CLOUZOT *et al.*, 2010; ESTRADA-ARRIAGA e MIJAYLOVA, 2011; RACZ *et al.*, 2012).

Um tempo de retenção de sólidos elevado (> 10 d) possibilita o desenvolvimento de uma maior diversidade microbiana, principalmente no que diz respeito a bactérias de crescimento lento em sistemas de biomassa em suspensão, como as nitrificantes que podem cometabolizar os estrogênios (conforme será descrito posteriormente) (CLARA *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b). Além disso, longos TRS permitem que os micro-organismos tenham um tempo maior de exposição aos compostos, desenvolvendo, assim, as enzimas correspondentes para a biodegradação dos estrogênios (TRAN *et al.*, 2013).

Na investigação de SERVOS *et al.* (2005), avaliou-se a remoção de E1 e E2 em 18 ETEs e as maiores eficiências de remoção dos estrogênios foram observadas nos dois sistemas de tratamento com os maiores valores de TRH (> 27 h) e TRS (> 35 dias). No extremo oposto, os dois sistemas de tratamento com os menores TRS (2,7 e 4,7 dias) apresentaram as maiores concentrações de E1 no efluente final produzido, em relação à alimentação. De acordo com os resultados obtidos por KOH *et al.* (2009) e MCADAM *et al.* (2010), sugere-se que eficiências de remoção por biodegradação maiores que 70% e 80% podem ser atingidas com TRS maiores do que 10 dias e 20 dias, respectivamente.

Entretanto, ao avaliar as relações entre a concentração de E1 no efluente tratado e os valores de TRS e TRH de 17 ETEs na Europa, JOHNSON *et al.* (2005) observaram baixos valores do coeficiente de correlação em escala logarítmica dupla, com $R^2 = 0,28$ para TRS, $R^2 = 0,39$ para TRH total da ETE e $R^2 = 0,16$ para TRH do tratamento biológico apenas.

3.7.1.3 Comunidade microbiana

Inúmeros estudos da literatura têm demonstrado que a composição da comunidade microbiana afeta diretamente a biodegradação de desreguladores endócrinos, tanto em escala de bancada quanto em ETEs (YI e HARPER, 2007; DE GUSSEME *et al.*, 2009; KHUNJAR *et al.*, 2011). As características do efluente (pH, temperatura, concentração de matéria orgânica, concentração de estrogênios) e as condições operacionais do sistema (TRS, TRH) podem influenciar direta ou indiretamente a composição da comunidade microbiana no reator biológico.

A relação entre as populações microbianas está diretamente relacionada com as cinéticas de biodegradação de estrogênios, conforme apresentado na revisão bibliográfica de HAMID e ESKICIOGLU (2012), onde estão compiladas as constantes de biodegradação de diversos estudos. Na investigação de KHUNJAR *et al.* (2011), concluiu-se que a biodegradação do EE2 pelas bactérias que oxidam a amônia é cinco vezes mais rápida do que pelas bactérias heterotróficas (sem considerar a sua mineralização).

Na biodegradação convencional, conhecida como metabolismo, os micro-organismos utilizam compostos orgânicos, incluindo os estrogênios, como substratos primários e fonte de energia e/ou carbono para o seu crescimento (VADER *et al.*, 2000; REN *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2013). Outra forma de biodegradação dos estrogênios é o cometabolismo, onde os micro-organismos utilizam outros compostos como fonte de energia e carbono para o crescimento microbiano e/ou para induzir a expressão de enzimas que atuam na assimilação dos estrogênios (REN *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b). Nas Figuras 3.6 e 3.7 estão apresentados os esquemas representativos do metabolismo e do cometabolismo, respectivamente, adaptados de TRAN *et al.* (2013).

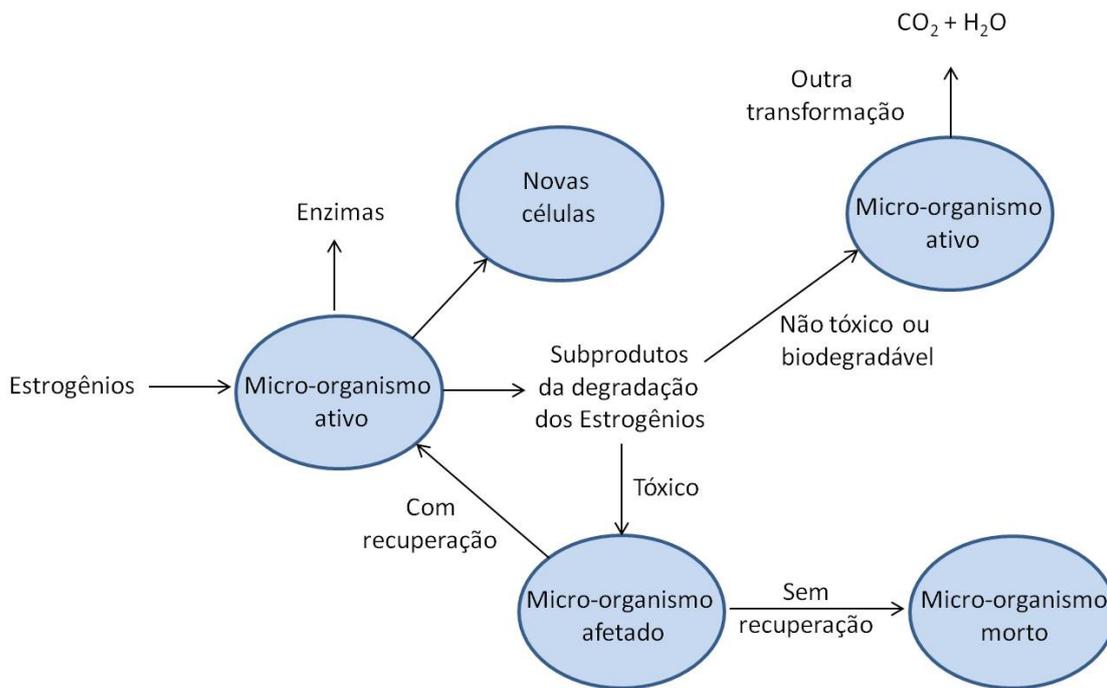


Figura 3.6: Esquema da biodegradação dos estrogênios via metabolismo (adaptado de TRAN *et al.*, 2013).

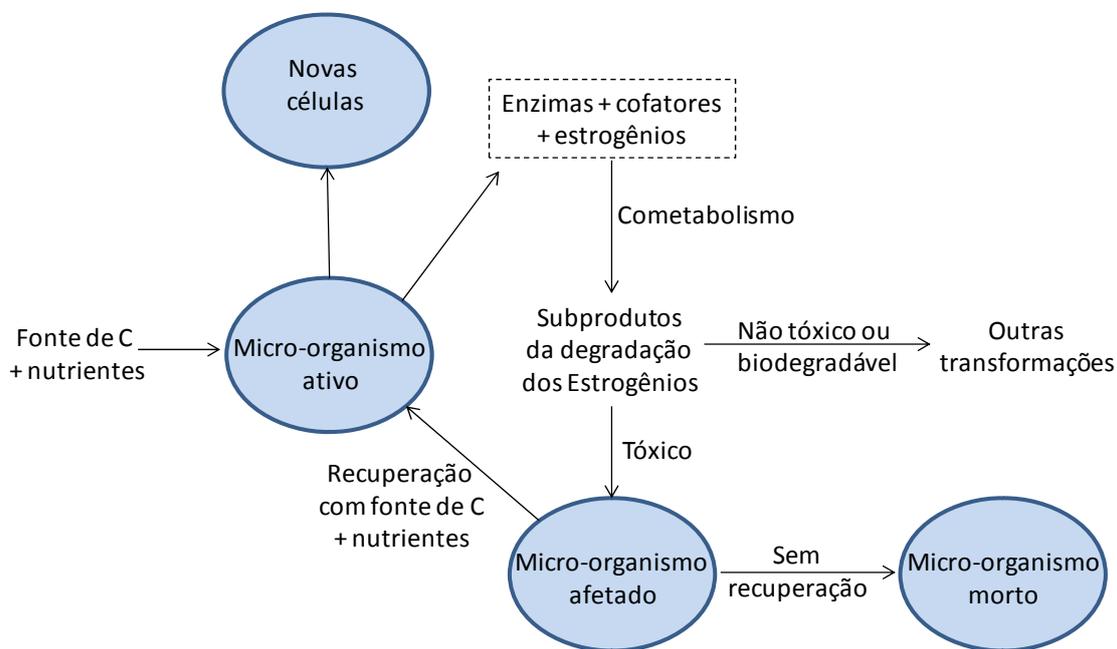


Figura 3.7: Esquema da biodegradação dos estrogênios via cometabolismo (adaptado de TRAN *et al.*, 2013).

As bactérias que oxidam a amônia são capazes de cometabolizar os estrogênios pela enzima amônia monooxigenase (AMO), enquanto que as bactérias heterotróficas podem metabolizar ou cometabolizar os estrogênios (KHUNJAR *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2013). Como os estrogênios encontram-se no esgoto sanitário em concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} , é de se esperar que a sua biodegradação por cometabolismo seja um mecanismo importante para sua remoção nas ETEs. Entretanto, ainda não está claro qual é a rota de biodegradação dominante na remoção dos estrogênios: o metabolismo ou o cometabolismo (YI *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2013), necessitando-se de novos estudos para elucidar completamente as rotas de degradação/mineralização dos estrogênios por biodegradação.

Além do metabolismo e cometabolismo, GAULKE *et al.* (2008) defendem a possibilidade de um terceiro mecanismo para transformação de estrogênios em reatores biológicos: a nitrificação abiótica. Neste mecanismo ocorre uma reação indireta abiótica entre o nitrito produzido durante a nitrificação e os estrogênios, com formação de estrogênios nitrogenados (como, por exemplo, 2-nitro-EE2, 4-nitro-EE2, 2,4-nitro-EE2). De acordo com os autores, esta reação é favorecida pela elevada concentração de nitrito, devido a concentrações altas de N-NH_4^+ ($200 - 500 \text{ mg.L}^{-1}$), sendo mais dificilmente observada em ETEs convencionais onde as concentrações de nitrito normalmente são inferiores a 1 mg.L^{-1} (JORDÃO e PESSÔA, 2009).

A remoção de estrogênios naturais e sintéticos por lodo ativado nitrificante vem sendo investigada desde os estudos de VADER *et al.* (2000). Posteriormente, a partir de pesquisas com culturas puras de *Nitrosomonas europaea* pode-se identificar subprodutos e confirmar que a transformação ocorria por cometabolismo (SKOTNICKA-PITAK *et al.*, 2009). O papel da amônia monooxigenase (enzima envolvida na primeira etapa da nitrificação) na degradação de EE2 foi comprovado por diversos autores com culturas puras de bactérias que oxidam amônia (BOA) (SHI *et al.*, 2004; KHUNJAR *et al.*, 2008; SKOTNICKA PITAK *et al.*, 2009), culturas enriquecidas de BOA (VADER *et al.*, 2000; YI e HARPER, 2007) e em lodo nitrificante (REN *et al.*, 2007; DE GUSSEME *et al.*, 2009).

Em alguns estudos da literatura foi observada uma relação linear entre a nitrificação e a remoção de EE2 por culturas enriquecidas de BOA (SHI *et al.*, 2004; YI e HARPER, 2007; ESTRADA-ARRIAGA e MIJAYLOVA, 2011). Em sistemas biológicos onde a nitrificação não se estabeleceu devido a, por exemplo, baixos valores

de TRS e temperatura, observaram-se baixas eficiências de remoção do estrogênio sintético EE2 (VADER *et al.*, 2000; ANDERSEN *et al.*, 2003; MAENG *et al.*, 2013).

Alguns autores sugerem que a remoção dos estrogênios no tratamento biológico é devido à atividade microbiana heterotrófica ao invés da degradação somente por cometabolismo por bactérias nitrificantes (SHI *et al.*, 2004; GAULKE *et al.* 2008). Isto foi demonstrado no estudo de BAGNALL *et al.* (2012) com a alteração da fonte de nitrogênio de amônia para nitrato, o que resultou na diminuição do número de bactérias que oxidam a amônia sem afetar a biodegradação dos estrogênios.

A avaliação da atuação das bactérias que oxidam a amônia foi realizada por alguns autores pela adição do composto 1-alil-2-tiouréia (ATU), que possui ação inibitória à enzima AMO, responsável pela primeira etapa da nitrificação (SHI *et al.*, 2004; DE GUSSEME *et al.*, 2009; FORREZ *et al.*, 2009; KHUNJAR *et al.*, 2011; RACZ *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2012; MAENG *et al.*, 2013). Uma redução da eficiência de remoção de EE2 de aproximadamente 40% foi observada nos sistemas com biomassa nitrificante (cultura não pura), após a adição de ATU na investigação realizada por SHI *et al.* (2004). Ao se adicionar ATU a cultura pura de *N. europaea*, verificou-se a inibição completa da remoção de E2 (SHI *et al.*, 2004). Resultados similares foram obtidos por RACZ *et al.* (2012) em que E2 foi quase completamente convertido em dois reatores em batelada sequencial operando com e sem adição de ATU.

SHI *et al.* (2004) trouxeram pela primeira vez o conceito de que as bactérias que oxidam a amônia são capazes de biotransformar sem levar a mineralização do EE2, que ocorre posteriormente pela ação de bactérias heterotróficas. Posteriormente, outros autores confirmaram esta teoria nos seus estudos com a identificação dos subprodutos formados na primeira etapa de biotransformação realizada pelas BOA (YI e HARPER, 2007; DE GUSSEME *et al.*, 2009; KHUNJAR *et al.*, 2011). Além disso, conclui-se que as bactérias heterotróficas também são capazes de levar a mineralização do EE2 (KHUNJAR *et al.*, 2011). As bactérias heterotróficas presentes nos reatores biológicos produzem uma variedade de enzimas monooxigenase e dioxigenase que são capazes de atuar na degradação dos estrogênios nestes sistemas (YI e HARPER, 2007; GAULKE *et al.*, 2008).

Muitas bactérias heterotróficas são capazes de metabolizar ou cometabolizar estrogênios naturais e sintéticos, conforme a lista de estudos que isolaram microorganismos apresentada na revisão de YU *et al.* (2013). WEBER *et al.* (2005) isolaram

duas cepas que utilizaram E2 (0,1 – 5,5 mg.L⁻¹) e E1 como substrato para crescimento, mas não metabolizaram o EE2: *Achromobacter xylooxidans* e *Ralstonia sp.*. No estudo de IASUR-KRUH *et al.* (2011), oito cepas capazes de degradar E2 (80 mg.L⁻¹) em E1 foram isoladas, entretanto, destas nenhuma metabolizou EE2 e somente uma foi capaz de degradar também o E1: EDB-LI1, 98% similaridade com *Novosphingobium JEM-1*, identificada como um membro da família das *Sphingomonadaceae*. Na investigação de PAUWELS *et al.* (2008), foram isoladas seis cepas capazes de cometabolizar EE2 somente com a metabolização concomitante de E1, E2 e E3, tanto em concentrações altas (5 – 10 mg.L⁻¹) quanto baixas (100 – 500 ng.L⁻¹) dos estrogênios. As cepas isoladas pertencem aos seguintes filos: proteobactéria alfa (*Phyllobacterium myrsinacearum*), proteobactéria beta (*Ralstonia pickettii*) e proteobactéria gama (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*).

Uma cepa capaz de degradar EE2 (25 mg.L⁻¹) como única fonte de carbono foi isolada por SHI *et al.* (2002): *Fusarium proliferatum* (cepa HNS-1), atingindo eficiências de remoção de 97%. LARCHER e YARGEAU (2013) mostraram a habilidade de degradação de EE2 por bactérias heterotróficas isoladas, comumente encontradas em sistemas de lodo ativado (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. sophii*). A maior eficiência de remoção foi obtida com *R. rhodochrous*, onde EE2 e seus metabólitos não foram detectados após 48 h. As outras bactérias apresentaram eficiências de remoção na faixa de 21 a 61%. Os autores avaliaram o efeito da atuação de todas as bactérias isoladas conjuntamente, atingindo uma remoção de 43% após 300 h, sem a observação de efeitos aditivos ou sinérgicos.

De acordo com KHUNJAR *et al.* (2011), existem diversas rotas para biodegradação dos estrogênios na presença de bactérias heterotróficas e nitrificantes que podem variar dependendo das condições operacionais do sistema. De maneira geral, sugere-se que sistemas com bactérias nitrificantes podem auxiliar na remoção dos estrogênios, atuando concomitantemente com bactérias heterotróficas para obtenção de melhores eficiências de remoção destes compostos.

3.7.2 Rotas de biodegradação dos estrogênios

Apesar das evidências quanto à remoção dos estrogênios naturais e sintéticos por micro-organismos, existem poucas informações a respeito das suas rotas de biodegradação.

A biodegradação do estrogênio natural E2 normalmente ocorre rapidamente em sistemas de lodo ativado onde mais de 90% do E2 foi convertido para E1 em 30 min (TERNES *et al.*, 1999b). De acordo com YU *et al.* (2013), a primeira etapa da biodegradação aeróbia do E2 pode ocorrer de quatro formas, sendo uma delas a desidrogenação do anel D em C-17 com formação de E1, cuja conversão foi confirmada experimentalmente por outros autores (TERNES *et al.*, 1999b; SHI *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2007). Na Figura 3.8 estão apresentadas as rotas de biodegradação do E2 confirmadas e propostas na literatura (adaptado de YU *et al.*, 2013).

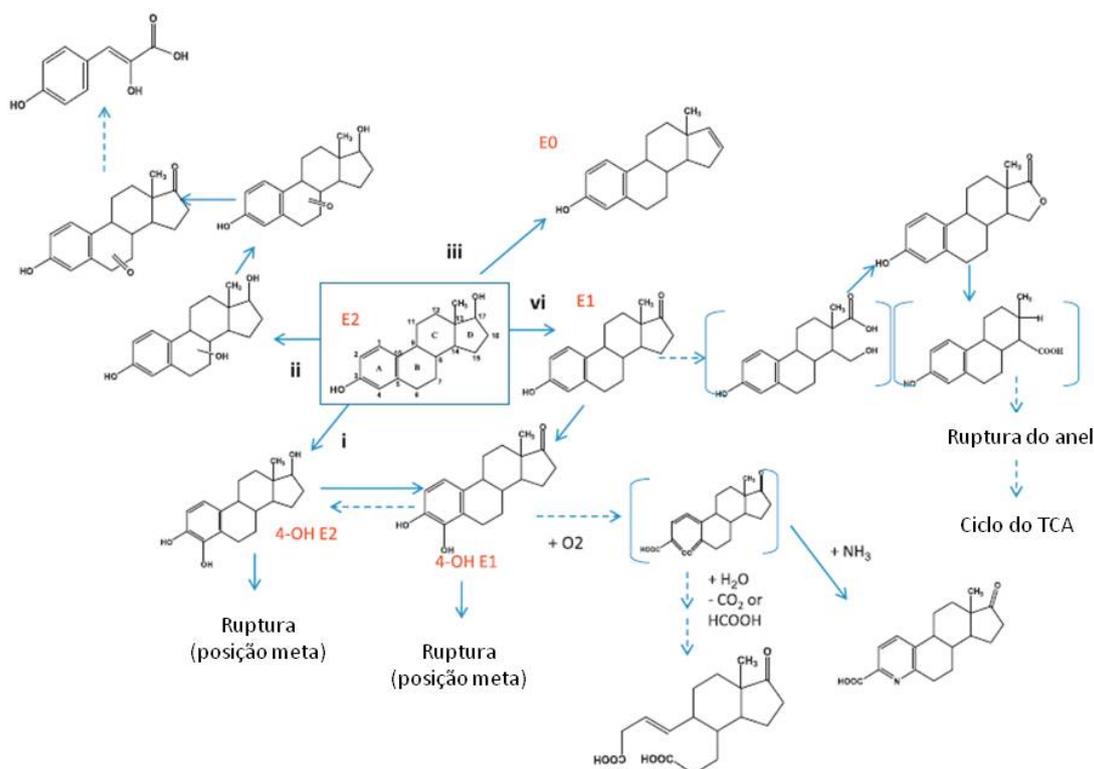


Figura 3.8: Rotas de biodegradação do E2 por bactérias aeróbias: (i) hidroxilação do anel A em C-4, (ii) hidroxilação do anel saturado, (iii) desidratação do anel D em C-17 e (iv) desidrogenação do anel D em C-17 (adaptado de YU *et al.*, 2013; rotas confirmadas em linhas sólidas e rotas propostas em linhas tracejadas).

O estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol é mais dificilmente biodegradado em ETEs devido ao seu grupo etinil, o qual impediria estericamente a atuação da enzima e o metabolismo do composto (PAUWELS *et al.*, 2008). De acordo com YU *et al.* (2013), a primeira etapa da biodegradação do EE2 pode ocorrer por cinco rotas, conforme apresentado na Figura 3.9. As rotas de biodegradação identificadas com as letras (b), (c) e (e) são realizadas por algas, já as rotas de interesse nesta tese são: (a) hidroxilação do anel A em C-2 e ruptura do anel A por bactérias nitrificantes e (d) conversão do anel D em C-17 por bactérias heterotróficas com formação de E1.

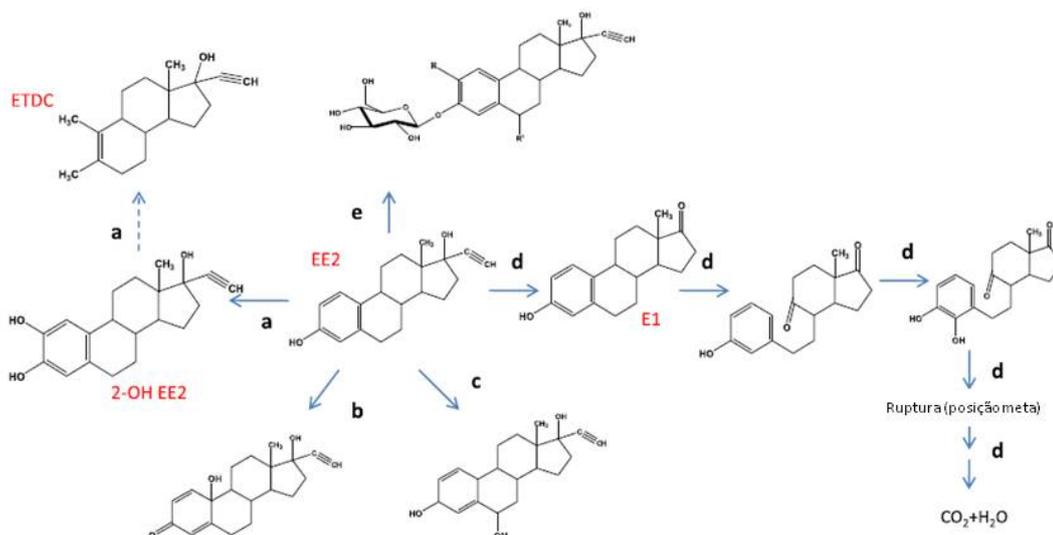


Figura 3.9: Rotas de biodegradação do EE2 por bactérias e algas: (a) hidroxilação do anel A em C-2 e ruptura do anel A por bactérias nitrificantes; (b) conversão de 3-OH no anel A por algas; (c) hidroxilação do anel B em C-6 por algas; (d) conversão do anel D em C-17 por bactérias heterotróficas; (e) conjugação por algas (adaptado de YU *et al.*, 2013; rotas confirmadas em linhas sólidas e rotas propostas em linhas tracejadas).

É importante ressaltar que a remoção da estrona nos sistemas de tratamento deve ser avaliada com cuidado, já que além da sua desconjugação na forma com sulfato ser mais lenta que outros estrogênios (TERNES *et al.*, 1999b; D'ASCENZO *et al.*, 2003), a estrona também é um subproduto da biodegradação do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol podendo apresentar constantes de biodegradação não condizente com a realidade. No estudo de TERNES *et al.* (1999b) a estrona aparentemente permaneceu resistente a biodegradação por 4h, sendo então removida em 50% após 24h.

3.8 Reator de leito móvel com biofilme

O reator de leito móvel com biofilme (*Moving Bed Biofilm Reactor – MBBR*) foi desenvolvido no final da década de 80 na Noruega, sendo considerado um reator híbrido, onde a biomassa se desenvolve aderida em suportes que se movimentam livremente pelo meio reacional. Na Figura 3.10 estão apresentados dois esquemas representativos da operação do MBBR de forma aeróbia, onde a movimentação dos suportes ocorre devido à aeração, e anóxica/anaeróbia, onde a movimentação ocorre por agitação mecânica. Em ambos os casos, os suportes são retidos no reator pela instalação de peneiras na saída.

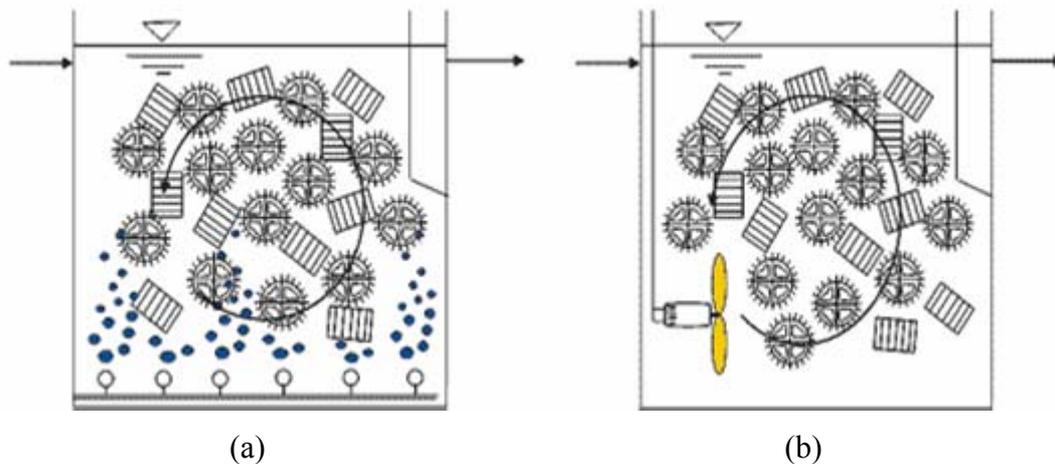


Figura 3.10: Esquema operacional do MBBR (a) aeróbio e (b) anóxico/anaeróbio (adaptado de VEOLIA, 2012).

Neste tipo de reator são utilizados suportes plásticos para maximizar a área superficial disponível para o desenvolvimento do biofilme. Existem inúmeros formatos, tamanhos e, conseqüentemente, áreas superficiais dos suportes disponíveis, sendo os da AnoxKaldnes[®] os mais comumente utilizados. Na Tabela 3.7 e na Figura 3.11 estão apresentadas as características e as imagens dos principais suportes da AnoxKaldnes[®], respectivamente.

Tabela 3.7: Características dos suportes da AnoxKaldnes[®] (adaptado de VEOLIA, 2012).

Característica	K1	K3	Biofilm Chip-P	Biofilm Chip-M
Diâmetro nominal (mm)	9	25	45	48
Comprimento nominal (mm)	7	12	3	2,2
Área específica superficial (m ² .m ⁻³)	500	500	900	1.200

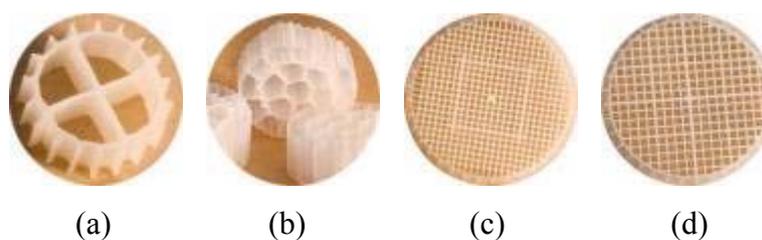


Figura 3.11: Suportes da AnoxKaldnes[®]: (a) K1, (b) K3, (c) Biofilm Chip-M e (d) Biofilm Chip-P (VEOLIA, 2012).

Um dos parâmetros operacionais mais importantes no MBBR é razão de recheio (V_s/V_R), definida como a razão entre o volume ocupado pelos suportes e o volume total do reator. De acordo com AYGUN *et al.* (2008), recomenda-se que a razão de recheio seja inferior a 0,7, para que haja uma boa hidrodinâmica dos suportes no interior do reator biológico.

O correto funcionamento/dimensionamento do sistema de aeração nos MBBRs aeróbios é de extrema importância, pois está diretamente relacionado à transferência de oxigênio aos micro-organismos e a manutenção da espessura do biofilme, além de manter os suportes em movimento e evitar zonas estagnadas (RUSTEN *et al.*, 2006). Esta aeração intensiva resulta em um aumento no consumo energético que encarece os custos operacionais do MBBR, sendo esta a principal desvantagem do processo.

O sistema MBBR apresenta uma menor perda de carga quando comparado a outros reatores com biofilme em suportes fixos (RUSTEN *et al.*, 2006). Ao se comparar o MBBR com sistemas biológicos convencionais, como sistema de lodos ativados, algumas vantagens são citadas na literatura: redução na área requerida para construção, com possibilidade de eliminação do decantador secundário, além da necessidade de menores TRH; área interfacial elevada entre biofilme e substratos; resistência a cargas de choque; baixa dependência das características do lodo para obtenção de efluente de

qualidade; TRS elevado com sistema sem recirculação de lodo; estabilidade operacional (RUSTEN *et al.*, 2006; ØDEGAARD, 2006; AYGUN *et al.*, 2008). De acordo com KHAN *et al.* (2013), a utilização de sistemas MBBRs no tratamento de efluentes domésticos e industriais vem crescendo, principalmente quando a etapa de nitrificação é requerida.

3.9 Remoção de estrogênios por sistemas com biomassa fixa

Nos últimos anos, uma grande quantidade de estudos tem sido conduzida com o intuito de avaliar a remoção de estrogênios em sistemas de tratamento biológico. Entretanto, a maior parte destes estudos utilizou reatores biológicos com biomassa em suspensão, principalmente sistemas de lodos ativados (CARBALLA *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; REN *et al.*, 2007; HASHIMOTO e MURAKAMI, 2009; CLOUZOT *et al.*, 2010; GABET-GIRAUD *et al.*, 2010; PLÓSZ *et al.*, 2010; SCHAAR *et al.*, 2010; SUAREZ *et al.*, 2010; RACZ *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2013; PESSOA *et al.*, 2014; PETRIE *et al.*, 2014a; MANICKUM e JOHN, 2014), sendo pouco investigada a remoção destes compostos em sistemas com biofilme (KHAN *et al.*, 2013). Apesar disso, LUO *et al.* (2014b) afirmam que os resultados obtidos nos poucos estudos com sistemas de biomassa fixa são promissores na remoção de micropoluentes.

De maneira geral, os sistemas com biomassa fixa apresentam algumas vantagens quanto a sistemas com biomassa em suspensão, que podem auxiliar na remoção de estrogênios, como: a) melhor transferência de oxigênio e nutrientes no biofilme, b) elevadas concentrações de biomassa, c) elevado tempo de retenção de sólidos e d) maiores taxas de nitrificação (JOHNSON *et al.*, 2005; CLOUZOT *et al.*, 2008; KOH *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2013). Somado a isso, o descarte de lodo em excesso nestes sistemas é reduzido quando em comparação com sistemas de biomassa em suspensão, o que diminui o problema da propagação da contaminação dos micropoluentes em lodo utilizado como fertilizante na agricultura.

A remoção de estrogênios em filtros biológicos de percolação normalmente é incompleta na fase aquosa e inferior às eficiências obtidas em outros reatores biológicos

em estudos comparativos (TERNES *et al.*, 1999a; SERVOS *et al.*, 2005; MARTI e BATISTA, 2014). Estas diferenças observadas na eficiência de remoção dos estrogênios têm sido atreladas às distintas condições operacionais dos sistemas, principalmente o TRH que normalmente é menor do que 1 h nos filtros biológicos de percolação (KOH *et al.*, 2008) e baixos TRS (BOLONG *et al.*, 2009).

Em um reator de biomassa fixa partindo de concentrações baixas de E2 e EE2 (45 e 160 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente), obteve-se a remoção quase completa do E2 e eficiência de remoção de 67% EE2 com TRH de 8 h; já com TRH de 32 h a eficiência de remoção do EE2 aumentou para 80% (PIEPER e ROTARD, 2011). No estudo de FORREZ *et al.* (2009) também foi observada a influência do TRH em um reator de leito fixo submerso na eficiência de remoção de EE2, com 96%, 81% e 74% para TRH de 4,3 d, 24 h e 7,2 h, respectivamente. Entretanto, de acordo com as investigações de JOSS *et al.* (2004), o TRH teria pouco ou nenhum efeito na remoção de estrogênios em um reator de leito fixo de uma ETE, sendo o elevado TRS dos sistemas de biofilme o responsável pelas eficiências de remoção de $90 \pm 3\%$ para E1, $\geq 95\%$ para E2 e $69 \pm 9\%$ para EE2 com TRH de 35 min.

Na investigação de KHAN *et al.* (2013) o objetivo principal foi avaliar os efeitos do material do suporte na adesão do biofilme, e por este motivo, a formação do biofilme ocorreu em placas (20 x 20 x 0,16 cm) de distintos materiais utilizados para fabricação dos suportes do MBBR. Concomitantemente, também se investigou a remoção de estrogênios ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) em sistema de batelada com biofilme nitrificante aderido as placas, onde se observou que a constante de velocidade de degradação de EE2 foi similar ao E1 e E2.

Na literatura aberta existem poucas pesquisas relacionadas com a remoção de estrogênios utilizando o reator de leito móvel com biofilme (MBBR). O sistema MBBR tem sido avaliado na remoção de estrogênios como tratamento terciário após tratamento convencional de esgoto com ou sem tratamento posterior com ozonização (GUNNARSSON *et al.*, 2009; LUNDSTRÖM *et al.*, 2010). Nestes casos a eficiência de remoção dos estrogênios foi superior a 90%, entretanto as características do efluente alimentado no MBBR eram completamente diferentes de esgoto sanitário. Já como tratamento biológico principal, a remoção de micropoluentes (incluindo os estrogênios) pelo sistema MBBR foi investigada por LUO *et al.* (2014a). Os autores atingiram eficiências globais de remoção de $89,6 \pm 8,5\%$, $96,2 \pm 2,2\%$ e $85,2 \pm 4,5\%$ para E1, E2

e EE2, respectivamente, com TRH de 24 h em efluente sintético com concentração inicial de estrogênios de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Sistemas reacionais

Três reatores de leito móvel com biofilme (MBBR) foram operados em paralelo para desenvolvimento de distintas comunidades microbianas (Figura 4.1). Os reatores utilizados foram construídos em acrílico, com dimensões de 21,5 cm x 15,0 cm x 8,0 cm (altura, largura e profundidade), resultando em um volume útil de 2 L para cada reator.

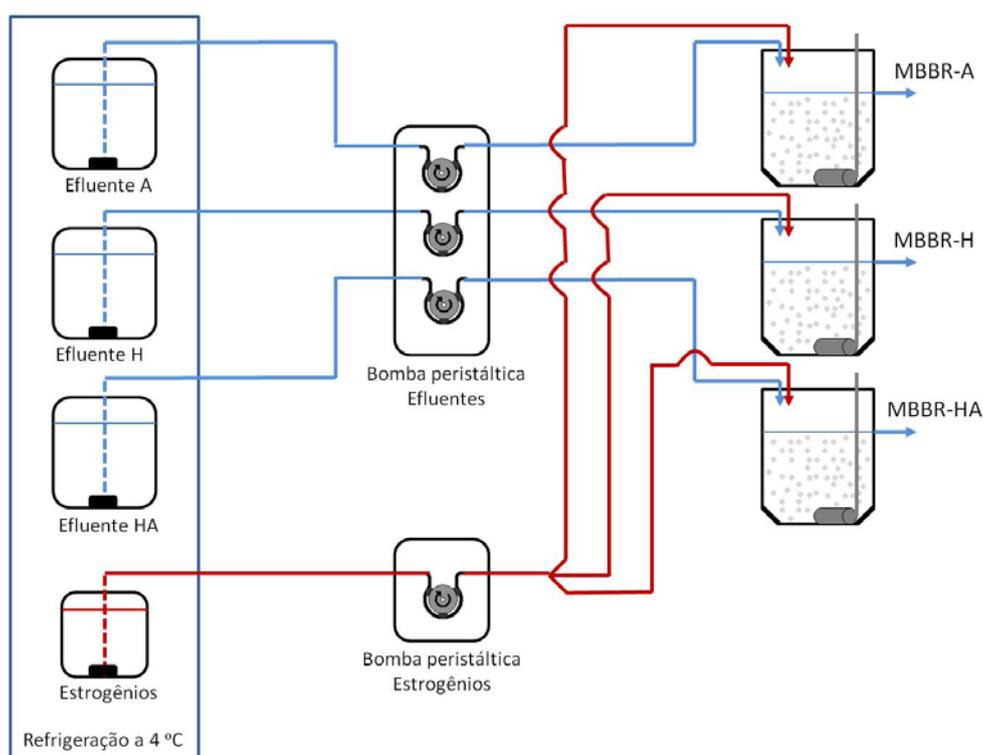


Figura 4.1: Representação esquemática do sistema reacional utilizado (os efluentes sintéticos estão detalhados no capítulo 4.2).

O leito móvel utilizado para desenvolvimento do biofilme foi o suporte K1 da AnoxKaldnes®, produzido em polietileno no formato de pequenos cilindros (7,2 mm de comprimento e 9,1 mm de diâmetro), conforme apresentado na Figura 4.2. Este suporte apresenta densidade aparente de $150 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e área superficial disponível para adesão de $500 \text{ m}^2\cdot\text{m}^{-3}$ (parte interna). Utilizou-se uma fração de enchimento (V_s/V_R) do suporte K1 de 50% que permaneceu constante nos três sistemas reacionais, resultando em uma área disponível para adesão do biofilme de $250 \text{ m}^2\cdot\text{m}^{-3}$.



Figura 4.2: Suporte K1 da AnoxKaldnes®.

Para assegurar a adequada transferência de oxigênio aos micro-organismos e a movimentação dos suportes K1, a aeração foi promovida pelo borbulhamento de ar comprimido por meio de difusores porosos (2,5 cm de diâmetro e 3,0 cm de comprimento), sendo a vazão ajustada por um rotômetro para cada reator.

Com o intuito de minimizar a sua degradação e/ou contaminação, os três efluentes sintéticos, descritos no item 4.2, foram mantidos em compartimentos separados sob refrigeração a 4 °C. Os sistemas reacionais foram operados em fluxo contínuo utilizando uma bomba peristáltica da Watson Marlow, modelo 323 com três cabeçotes – um para cada conjunto efluente/reator.

A partida dos reatores biológicos ocorreu com a adição do inoculo proveniente do reciclo de lodo do sistema de lodo ativado da Estação de Tratamento de Esgoto Alegria da Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE). A amostra de lodo foi concentrada por sedimentação imediatamente após a sua chegada ao laboratório, sendo posteriormente adicionada aos três reatores. Os MBBRs operaram em regime de batelada nas primeiras 24 h e, posteriormente, em fluxo contínuo em duas condições operacionais com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 12 e 8 h.

A definição das condições operacionais baseou-se nos resultados da literatura em que aumentando os valores de TRH e TRS (tempo de retenção dos sólidos) obtiveram-se as melhores eficiências de remoção de estrogênios (CLARA *et al.*, 2005; TRAN *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b). Nos sistemas com biofilme o TRS é elevado devido ao fato que os micro-organismos permanecem aderidos nos suportes e apenas uma pequena parcela da biomassa se desprende dos suportes e é

carreada juntamente com o efluente. De acordo com a literatura, para sistemas com lodo em suspensão um TRH na ordem de 12h resultou em altas eficiências de remoção de estrogênios (ESTRADA-ARRIAGA e MIJAYLOVA, 2011).

Após o período de estabilização do sistema para adesão e desenvolvimento do biofilme nos reatores, adicionou-se a alimentação dos estrogênios (E2 e EE2) com o auxílio de uma bomba peristáltica multicanais da *Longer Pump*, modelo BT100-2J.

4.1.1 Hidrodinâmica dos reatores biológicos

A seleção da vazão de ar comprimido adequada para movimentação dos suportes plásticos nos três reatores biológicos ocorreu a partir dos resultados de testes hidrodinâmicos de tempo de mistura. Estes testes devem ser realizados antes do início da operação dos sistemas para evitar a existência de zonas estagnadas nos reatores aeróbios, que podem resultar em uma diminuição da eficiência de remoção devido à falta de oxigenação e redução do coeficiente de transferência de massa na região estagnada.

Os testes hidrodinâmicos para determinação do tempo de mistura (t_m) dos três reatores ocorreram através da técnica de estímulo e resposta, com a adição de uma solução concentrada de cloreto de sódio como traçador salino (160 g.L^{-1}). Um pulso instantâneo de 10 mL do traçador salino foi injetado no ponto de alimentação de cada um dos reatores operando em batelada com água destilada e suportes plásticos limpos (sem biofilme). Distintas vazões de ar (Q_G) e, conseqüentemente, distintas velocidades ascensionais de ar (U_G) foram testadas nos três sistemas reacionais, sempre em duplicata, conforme apresentado na Tabela 4.1. A condutividade na saída dos reatores foi acompanhada ao longo do tempo utilizando um condutivímetro da Digimed, modelo DM-32, até a estabilização dos valores observados.

Tabela 4.1: Vazões de ar e velocidades ascensionais de ar utilizadas nos testes de tempo de mistura nos reatores biológicos.

MBBR-A		MBBR-H		MBBR-HA	
Q_G (L.h ⁻¹)	U_G (m.h ⁻¹)	Q_G (L.h ⁻¹)	U_G (m.h ⁻¹)	Q_G (L.h ⁻¹)	U_G (m.h ⁻¹)
181	15,1	189	15,8	179	14,9
216	18,0	226	18,8	221	18,4
251	20,9	258	21,5	256	21,3
268	22,4	279	23,3	274	22,8

4.2 Efluentes sintéticos

De acordo com os dados da literatura apresentados anteriormente no capítulo 3.7, a biodegradação dos estrogênios em reatores biológicos aeróbios é devida a contribuição tanto de bactérias heterotróficas quanto de bactérias nitrificantes; cada comunidade microbiana com cinética e mecanismos de degradação distintos (RACZ *et al.*, 2012). Para avaliar a eficiência de remoção destas comunidades microbianas em sistemas com biofilme, três reatores de leito móvel com biofilme (MBBR) foram operados em paralelo. Efluentes sintéticos distintos foram alimentados em cada um dos três reatores, com o intuito de favorecer o desenvolvimento de diferentes comunidades microbianas em cada sistema em detrimento de outras: 1) cultura enriquecida em bactérias autotróficas (MBBR-A), 2) cultura enriquecida em bactérias heterotróficas (MBBR-H) e 3) cultura com ambos os grupos: bactérias heterotróficas e autotróficas (MBBR-HA).

Nos experimentos utilizou-se efluente sintético com o intuito de diminuir a variabilidade da sua composição (pH, concentração de matéria orgânica, sólidos suspensos, entre outros) durante a operação. Além disso, o conhecimento dos compostos presentes auxilia no entendimento da contribuição das comunidades microbianas na remoção de estrogênios nos reatores com biofilme operando em estado estacionário.

Efluente Autotrófico

Para o desenvolvimento e enriquecimento do biofilme nitrificante, o reator autotrófico foi alimentado com um efluente sintético, cuja composição foi baseada em LIANG *et al.* (2011), com algumas adaptações em relação a concentração de cloreto de amônio e bicarbonato de sódio para que o reator operasse com pH em torno de 7,0 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Composição do efluente sintético para sistema MBBR-A baseado em LIANG *et al.* (2011) com algumas modificações.

Composto	Fórmula química	Concentração (mg.L⁻¹)
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	900
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	400
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	140
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	30

Efluente Heterotrófico

De acordo com HOOPER e TERRY (1973), alguns compostos são capazes de inibir a enzima amônia monooxigenase (AMO) que é responsável pela primeira etapa do processo de nitrificação. Com o intuito de avaliar a degradação dos estrogênios majoritariamente pelas bactérias heterotróficas, utilizou-se o composto 1-alil-2-tiouréia (ATU) que possui ação inibitória às bactérias nitrificantes. Desta forma, o ATU (pureza de 98%, Sigma-Aldrich) foi adicionado ao efluente sintético heterotrófico com concentração de 10 mg.L⁻¹, assim como utilizado por diversos autores (SHI *et al.*, 2004; DE GUSSEME *et al.*, 2009; FORREZ *et al.*, 2009; KHUNJAR *et al.*, 2011; RACZ *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2012; MAENG *et al.*, 2013).

Para o desenvolvimento de um reator com predominância de bactérias heterotróficas utilizou-se o efluente sintético, cuja composição foi baseada em KHUNJAR *et al.* (2008) com algumas modificações (Tabela 4.3). A fonte de carbono foi alterada para glicose, simulando um substrato facilmente biodegradável, com um valor de DQO em torno de 400 mg.L⁻¹ e a concentração de nitrogênio amoniacal foi reduzida para 20 mg.L⁻¹, valores médios normalmente observados em esgoto sanitário (JORDÃO e PESSÔA, 2009).

Tabela 4.3: Composição do efluente sintético para sistema MBBR-H baseado em KHUNJAR *et al.* (2008) com algumas modificações.

Composto	Fórmula química	Concentração (mg.L⁻¹)
1-alil-2-tiouréia (ATU)	C ₄ H ₈ N ₂ S	10
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	76,4
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	5,3
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	136
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	54
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	375
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	30

Efluente Autotrófico e Heterotrófico

O efluente sintético para desenvolvimento simultâneo das comunidades microbianas autotrófica e heterotrófica foi similar ao efluente heterotrófico descrito anteriormente (baseado em KHUNJAR *et al.*, 2008), com algumas modificações: aumento da concentração de nitrogênio amoniacal e adição do bicarbonato de sódio para controle do pH do meio devido à nitrificação, conforme detalhado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Composição do efluente sintético para sistema MBBR-HA baseado em KHUNJAR *et al.* (2008) com algumas modificações.

Composto	Fórmula química	Concentração (mg.L⁻¹)
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	400
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	190
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	5,3
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	136
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	54
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	375
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	30

Solução de Micronutrientes

Uma solução de micronutrientes (Tabela 4.5), baseada na composição proposta por VISHNIAC e SANTER (1957), foi adicionada aos três efluentes sintéticos descritos anteriormente na proporção de 0,1 mL.L⁻¹, conforme utilizado por VADER *et al.* (2000).

Tabela 4.5: Composição da solução de micronutrientes (baseado em VISHNIAC e SANTER, 1957).

Composto	Fórmula química	Concentração (g.L ⁻¹)
Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	50
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	7,34
Cloreto de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,61
Cloreto de manganês tetrahidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	5,06
Molibdato de amônio tetrahidratado	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,10
Sulfato de cobre II pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57
Sulfato de ferro II heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,99
Sulfato de zinco	ZnSO ₄	12,4

4.3 Estrogênios

Os estrogênios utilizados neste estudo foram 17 β -estradiol (pureza \geq 98%), 17 α -etinilestradiol (pureza \geq 98%) e estrona (pureza \geq 99%), todos da marca Sigma-Aldrich. Soluções padrão dos estrogênios com concentrações de 5 mg.L⁻¹ foram preparadas com acetona e armazenadas em frasco âmbar a 4 °C, sendo utilizadas para obtenção das curvas de calibração e injeção de padrões para controle analítico durante as análises por cromatografia gasosa.

Posteriormente ao período de estabilização dos reatores biológicos os estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol foram adicionados aos reatores, separadamente dos efluentes sintéticos, a partir de uma solução estoque mantida sob refrigeração a 4 °C para obtenção de concentração no efluente de 1.000 μ g.L⁻¹. A estrona não foi alimentada aos reatores para que fosse possível quantificar este composto que,

conforme a literatura, é um produto intermediário na biodegradação do 17 β -estradiol (TERNES *et al.*, 1999b).

De acordo com CLOUZOT *et al.* (2008), para concentração por extração em fase sólida (EFS) de estrogênios em amostras ambientais é necessária a utilização de volumes em torno de 1 L. Devido à baixa vazão de alimentação utilizada nos reatores biológicos, para a obtenção de amostras com volumes em torno de 1 L seria necessário um período de aproximadamente 6 h de coleta (TRH de 12 h), o que poderia ocasionar a degradação/alteração da amostra. Desta forma, optou-se pela utilização de uma concentração maior de estrogênios na alimentação para facilitar a etapa analítica de quantificação dos hormônios na fase líquida e reduzir o volume utilizado para EFS. Além disso, utilizando concentrações maiores de estrogênios é possível discriminar mais claramente as diferenças nos resultados obtidos nos três reatores biológicos.

Outros autores também utilizaram concentrações de estrogênio similares ou superiores (SHI *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2005; YI e HARPER, 2007; KHUNJAR *et al.*, 2008; SKOTNICKA-PITAK *et al.*, 2009; CLOUZOT *et al.*, 2010; RACZ *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2013; LARCHER e YARGEAU, 2013). De acordo com os estudos de inibição das bactérias nitrificantes realizados por KHUNJAR *et al.* (2008), a concentração de EE2 de até 1 mg.L⁻¹ não é capaz de inibir as bactérias *Nitrosomonas europaea*.

4.4 Metodologia analítica

4.4.1 Demanda química de oxigênio

O parâmetro global utilizado para quantificação da matéria orgânica nos sistemas foi a Demanda Química de Oxigênio (DQO) que representa a quantidade de oxigênio necessária para oxidar os compostos biodegradáveis e não biodegradáveis de uma amostra através da ação de um agente oxidante forte.

O método colorimétrico 5220 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) foi utilizado para determinação da DQO, onde o agente oxidante é o dicromato de potássio em meio ácido (ácido sulfúrico). A análise é conduzida em uma placa digestora da PoliControl com temperatura de 150°C durante duas horas. A leitura da absorbância a 420 nm (DQO na faixa de 10 a 100 mg.L⁻¹) ou

600 nm (DQO na faixa de 100 a 1000 mg.L⁻¹) foi realizada em um espectrofotômetro da Hach, modelo DR 2800. Os resultados de DQO são expressos em mg O₂.L⁻¹ baseados em curvas de calibração previamente montadas pela análise de padrões de biftalato de potássio. As análises deste parâmetro foram realizadas em triplicata. No Anexo A encontram-se exemplos das curvas de calibração utilizadas para determinação da análise de DQO.

Os resultados de DQO solúvel (DQO_s) foram obtidos a partir da filtração das amostras com membranas de nitrato de celulose (diâmetro médio de poro de 0,45 µm) e bomba de vácuo da Primatec, modelo 121.

4.4.2 Nitrogênio amoniacal

A determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺) foi realizada pelo método colorimétrico de *Nessler* de acordo com a metodologia 4500-C do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1992).

O reagente de *Nessler* é uma solução alcalina de iodeto de mercúrio e potássio que reage com a amônia ionizada, formando uma dispersão coloidal com coloração castanho-amarelada. A intensidade de cor produzida é proporcional à concentração de nitrogênio amoniacal presente na amostra, sendo quantificada pela medida da absorbância a 425 nm em um espectrofotômetro da Hach, modelo DR 2800, e com uma curva de calibração (padrão de cloreto de amônio). As amostras foram previamente filtradas em membranas de nitrato de celulose (diâmetro médio de poro de 0,45 µm) e bomba de vácuo Primatec, modelo 121. A quantificação de nitrogênio amoniacal foi realizada sempre em triplicata. No Anexo A encontra-se a curva de calibração utilizada para determinação da análise de nitrogênio amoniacal.

4.4.3 Nitrato e nitrito

A quantificação concomitante de ânions como nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) pode ser realizada somente por cromatografia iônica cuja metodologia é padronizada (seção 4110 – APHA, 2005).

No cromatógrafo de íons da marca Dionex, modelo ICS-90, a amostra filtrada em membranas de nitrato de celulose (diâmetro médio de poro de 0,45 μm) foi injetada em uma coluna aniônica (modelo AS14A 4-mm). A amostra foi carregada pelo eluente (solução de carbonato de sódio 8 mmol.L^{-1}) sendo bombeada até a coluna onde os ânions foram segregados com base na afinidade com os sítios ativos da coluna. Uma solução de ácido sulfúrico (25 mmol.L^{-1}) foi utilizada como regenerante da coluna. A concentração dos ânions foi determinada pela medida da condutividade no final da coluna aniônica, juntamente com curvas de calibração de nitrato e nitrito. As análises foram realizadas em duplicata. No Anexo A encontram-se as curvas de calibração utilizadas para determinação das análises de nitrito e nitrato.

4.4.4 Alcalinidade

A alcalinidade é uma medida da capacidade da água/amostra de neutralizar um ácido, ou seja, a capacidade de resistir às mudanças de pH; sendo devida, principalmente, à presença de carbonatos e bicarbonatos.

O método utilizado para determinação da alcalinidade foi o titulométrico da seção 2320 da APHA (2005), que consiste na titulação da amostra com ácido sulfúrico até o pH de 8,3 (alcalinidade à fenolftaleína) ou 4,5 (alcalinidade total). A determinação da alcalinidade total até o pH 4,5 ocorreu com o auxílio de um medidor de pH da Digimed, modelo DM-23. Os resultados são expressos em $\text{mg de CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ e as análises realizadas em duplicata.

4.4.5 Sólidos suspensos totais e voláteis

As análises de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) nas seções 2540D e E, respectivamente.

A metodologia para análise de SST consiste na filtração das amostras (20 – 200 mL, dependendo da quantidade de sólidos suspensos) com membrana de fibra de vidro (diâmetro médio de poro de 0,45 μm) e bomba de vácuo (Primatec, modelo 121).

Posteriormente, as membranas passam por uma etapa de secagem durante 12 h a 105 °C (estufa da Fabbe-Primar, modelo 219), sendo determinada a concentração de SST pela sua pesagem. A membrana é então submetida à calcinação a 550 °C durante 30 min utilizando uma mufla da Pyrotec e a partir da pesagem do material determina-se a concentração de sólidos suspensos fixos (SSF), e por diferença com SST obtém-se a concentração de SSV. A balança analítica da Mettler Toledo, modelo XS205 foi utilizada para as pesagens, sendo todas as determinações realizadas em duplicata.

4.4.6 pH e temperatura

As determinações de pH foram realizadas com um medidor de pH da Digimed, modelo DM-23, pelo método potenciométrico (seção 4500) (APHA, 2005). O equipamento foi calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. A temperatura das amostras foi determinada pelo mesmo equipamento, sendo expressa em graus Celsius (°C).

4.4.7 Turbidez

A turbidez é a medida da opacidade de um efluente comparada com certos padrões, sendo definida como a leitura de intensidade de luz desviada pelas partículas finamente divididas em suspensão ou dispersão coloidal num ângulo de 90° em relação à luz incidente – o princípio nefelométrico. A turbidez de uma amostra é proporcional à intensidade de luz espalhada, sendo expressa em unidades nefelométricas de turbidez (UNT).

A quantificação dos valores de turbidez foi realizada pelo método nefelométrico em um turbidímetro AP-2000 da PoliControl, calibrado com padrões de formazina, conforme o método padronizado 2130 (APHA, 2005).

4.4.8 Biomassa seca aderida

A quantificação do biofilme aderido aos suportes dos MBBRs foi realizada pela determinação da biomassa seca aderida. O procedimento proposto baseia-se na secagem dos suportes, retirados dos reatores, em estufa a 105 °C por 12 h com posterior resfriamento e pesagem, cujo valor descontado-se a massa do suporte limpo. Com os valores de biomassa seca aderida pode-se ter uma boa estimativa da variabilidade da quantidade de biomassa aderida ao longo da operação de cada reator.

4.4.9 Polissacarídeos e proteínas totais

Os polissacarídeos totais (PS) e proteínas totais (PT) da biomassa aderida ao suporte referem-se tanto ao material intracelular quanto ao extracelular. Primeiramente, as amostras foram submetidas a uma etapa de lise completa das células pela imersão de dois suportes com biofilme em 5 mL de NaOH 1 N em um tubo que permaneceu em banho-maria a 100 °C por 5 min. Utilizou-se uma centrífuga da Quimis, modelo Q222T, para separação das fases com 1.500 x g por 15 min. A fase líquida foi então filtrada em membrana de éster celulose (diâmetro médio de poro de 0,22 µm) utilizando bomba de vácuo da Primatec, modelo 121.

O método de DUBOIS (1956) foi utilizado para determinação de polissacarídeos totais das amostras. Nesta metodologia, as amostras são aquecidas pela adição de ácido sulfúrico e fenol para desenvolvimento de cor proporcional a concentração de polissacarídeos. O método de BRADFORD (1976) foi utilizado na determinação de proteínas totais no qual as proteínas reagem com o composto *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Para a análise de polissacarídeos e proteínas utilizou-se o espectrofotômetro da Hach, modelo DR 2800, para leitura da absorbância a 500 nm e 595 nm, utilizando a glicose e a albumina de soro bovina como padrões das curvas de calibração, respectivamente. Ambas as análises foram realizadas sempre em triplicata. No Anexo A encontram-se as curvas de calibração utilizadas para determinação das análises de polissacarídeos e proteínas totais.

4.4.10 Microscopia óptica

A análise por microscopia óptica da microfauna presente nos biofilmes permitiu observar: a) alterações ocorridas ao longo do período de estabilização e após a adição dos estrogênios, b) estrutura do biofilme e c) presença de protozoários e metazoários. As observações foram realizadas por meio do microscópio óptico da Boeco, modelo BM-800, com câmera acoplada para a obtenção das imagens. As amostras de biofilme foram removidas dos suportes por raspagem, sendo transferidas para lâminas de microscópio e recobertas com lamínulas.

4.4.11 Estrogênios

Os estrogênios naturais (E1, E2) e estrogênios sintéticos (EE2) podem ser analisados simultaneamente devido à similaridade das suas propriedades físico-químicas (TERNES, 2001; FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004). Entretanto, devido às baixas concentrações dos estrogênios e/ou a complexidade das matrizes ambientais, tanto em amostras de água e efluente quanto em amostras de lodo biológico e sedimento, faz-se necessário algum tipo de tratamento e concentração das amostras antes da quantificação.

Na literatura existem inúmeras metodologias propostas para as etapas de preparo e quantificação das amostras, sendo realizadas separadamente, e de forma distinta, para a fase líquida e fase sólida. Na Figura 4.3 estão apresentados dois fluxogramas com as metodologias utilizadas na quantificação de estrogênios baseadas em TERNES *et al.* (1999a) e TERNES *et al.* (2002) para amostras líquidas e amostras de lodo biológico, respectivamente. O detalhamento de cada etapa das metodologias está descrito nos capítulos a seguir.

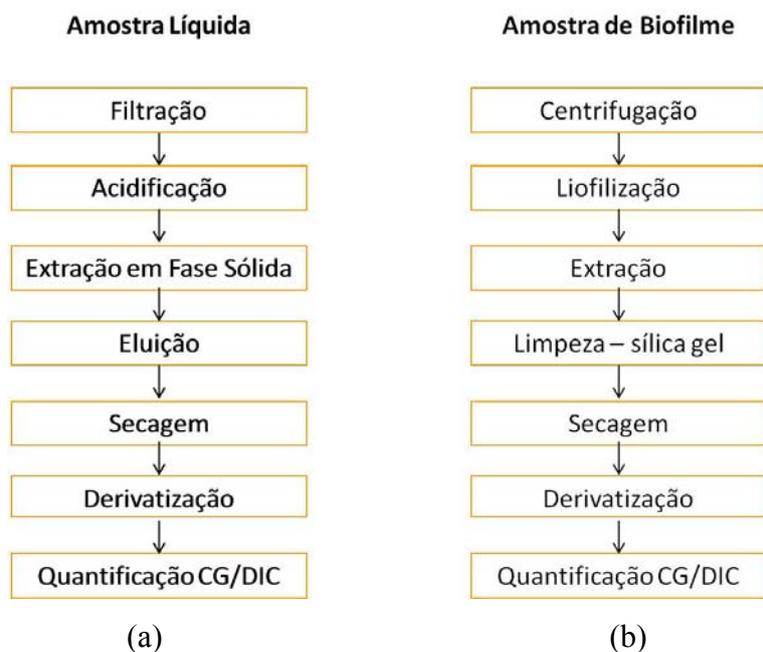


Figura 4.3: Métodos analíticos para quantificação de estrogênios: a) na fase líquida (baseado em TERNES *et al.*, 1999a) e b) no biofilme (baseado em TERNES *et al.*, 2002).

4.4.11.1 Concentração e limpeza das amostras

Amostras Líquidas

Conforme mencionado no item 4.2, concentrações de estrogênios maiores do que as observadas em amostras de esgoto sanitário foram utilizadas para alimentação dos reatores. Por este motivo, foi possível utilizar volumes menores das amostras para a etapa de concentração. As análises das amostras aquosas foram realizadas imediatamente após a coleta com o propósito de evitar alterações devido à biodegradação dos estrogênios, além de evitar a alteração das mesmas pela adição de algum tipo de preservante.

Primeiramente, a amostra passou por uma etapa de filtração em membrana de acetato de celulose (diâmetro médio do poro de 0,45 μm) para evitar o entupimento do cartucho da extração em fase sólida, na fase posterior (GUITART e READMAN, 2010; PESSOA *et al.*, 2014). O pH de cada amostra foi ajustado para 3,0 com uma solução de ácido fosfórico.

Os métodos comumente utilizados para determinação de desreguladores endócrinos em amostras aquosas englobam uma etapa de pré-concentração para enriquecimento e limpeza das amostras. Esta etapa é necessária para minimizar o efeito das matrizes durante a análise, que pode resultar na supressão ou ampliação da intensidade do sinal obtido no cromatógrafo, alterando as recuperações do método analítico e piorando a reprodutibilidade dos resultados (CHEN *et al.*, 2012b). Para esta etapa de pré-concentração utilizou-se a extração em fase sólida (EFS) baseada na metodologia proposta por TERNES *et al.* (1999a).

Um esquema da etapa de extração em fase sólida das amostras está detalhado na Figura 4.4. Os cartuchos HF *Bond Elut C18 OH* da Varian (500 mg, 3 mL) foram utilizados para extração sendo previamente condicionados pela passagem de 3 x 2 mL de hexano (pureza de 95%, Tedia), seguido por 1 x 2 mL de acetona (pureza >99,9%, Sigma-Aldrich) e 3 x 2 mL de metanol (grau CG, Tedia), com posterior lavagem com 5 x 2 mL de água Milli-Q em pH 3. Os cartuchos foram acoplados a um sistema automático de EFS (*Manifold* da *Agilent Technologies*) e este a uma bomba de vácuo (modelo 121, Primatec) cujo vácuo foi utilizado para regulagem da vazão de alimentação das amostras (200 mL) para aproximadamente 20 mL.min⁻¹, com posterior descarte do eluato.

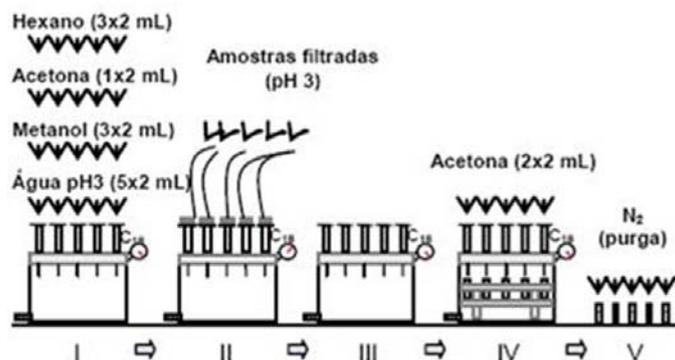


Figura 4.4: Procedimento esquemático da EFS: I – condicionamento do cartucho; II – extração; III – secagem do cartucho; IV – eluição; V – secagem da acetona (adaptado de DIAS *et al.*, 2010).

A secagem dos cartuchos ocorreu por vácuo durante 30 min. Os compostos adsorvidos no cartucho foram eluídos com 4 x 1 mL de acetona (sob gravidade), sendo coletados em *vials*. A evaporação completa do solvente foi conduzida por uma corrente de nitrogênio, seguindo então para a etapa de derivatização.

A recuperação da etapa de extração em fase sólida foi verificada através da comparação dos resultados obtidos na quantificação dos estrogênios por dois caminhos distintos: (a) adição de concentração conhecida dos estrogênios em uma amostra aquosa com posterior EFS e (b) solução padrão dos estrogênios (Figura 4.5). As análises para avaliação da recuperação da EFS foram determinadas com concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos estrogênios e cinco réplicas.

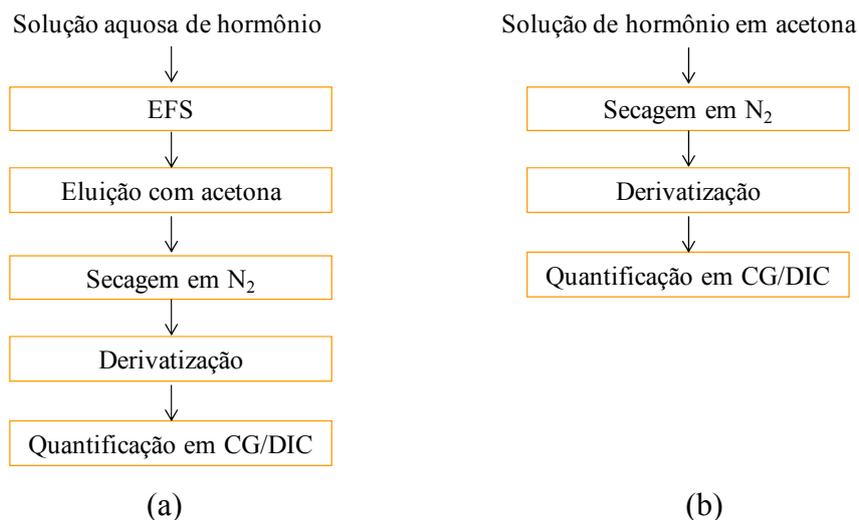


Figura 4.5: Fluxograma das metodologias analíticas utilizadas para avaliar a eficiência do processo de extração em fase sólida para (a) solução aquosa de hormônio e (b) solução de hormônio em acetona.

Amostras Sólidas

A metodologia para extração dos estrogênios do biofilme foi baseada em TERNES *et al.* (2002), utilizada para amostra de biomassa de sistemas de lodo ativado. As amostras do biofilme aderido foram removidas dos suportes por agitação, sendo concentradas em uma centrífuga da Quimis, modelo Q222T, com $1.500 \times g$ durante 15 min e então congeladas, com o intuito de prevenir a ação dos micro-organismos. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas em um equipamento da *Thermo Electron Corporation*, modelo *Modulyod Freeze Dryer*.

A extração por ultrassom com solvente ocorreu em 0,5 g da amostra liofilizada com 2 x 4 mL de metanol e 2 x 3 mL de acetona. Em cada uma das quatro etapas da extração a amostra foi colocada durante 10 min em um ultrassom da marca Thornton,

modelo MS 200. A mistura foi então centrifugada com 1500 x g durante 5 min e os sobrenadantes coletados todos em um mesmo frasco.

Para a determinação de estrogênios em amostras de sedimento ou lodo, é necessária uma etapa de limpeza da amostra para eliminar as interferências da matriz (GOMES *et al.*, 2003). Diversos métodos de limpeza podem ser aplicados; optou-se pela limpeza com coluna de sílica gel, também de acordo com o que foi proposto por (TERNES *et al.*, 2002).

A sílica gel (*grade 7734*, tamanho de poro 60 Å, 70 – 230 mesh da Sigma-Aldrich) foi aquecida a 150 °C durante 8 h e posteriormente desativada com 1,5% de água (m/m). Para a montagem da coluna adicionou-se 1 g de sílica gel (após mistura com 5 mL de hexano/acetona (65:35, v/v)) em um cartucho de vidro de 6 mL. Os sobrenadantes provenientes da extração com ultrassom foram transferidos para a coluna de sílica gel, sendo então eluídos com 5 mL de hexano/acetona (65:35, v/v). A amostra coletada passou por uma corrente de nitrogênio para secagem completa, e sendo, posteriormente, direcionada para a etapa de derivatização.

Amostras de biofilme foram coletadas durante o período de estabilização dos reatores biológicos para avaliação da recuperação da extração/limpeza das amostras sólidas, cuja metodologia foi baseada em TERNES *et al.* (2002). Soluções padrão em acetona dos três estrogênios com concentrações de 0,10 µg.g⁻¹ foram adicionadas às amostras liofilizadas. A mistura foi agitada vigorosamente sendo deixada em repouso por 24 h em capela para que ocorresse o contato dos estrogênios com o lodo e a evaporação do solvente. A recuperação da extração/limpeza foi determinada pela análise destas amostras em cinco réplicas comparando-se o resultado obtido com as concentrações iniciais adicionadas às amostras de lodo.

4.4.11.2 Cromatografia gasosa

Um pré-requisito para determinação de compostos por cromatografia gasosa é que estes sejam voláteis e termicamente estáveis. Os estrogênios são substâncias não voláteis e por este motivo, uma etapa de derivatização, anterior à análise por cromatografia gasosa, deve ser realizada (GOMES *et al.*, 2003; FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004).

A derivatização é uma reação química de modificação da estrutura da molécula para melhorar suas propriedades cromatográficas. A reação de derivatização de compostos orgânicos que contenham os grupos funcionais, como por exemplo –COOH, –NH, –SH e –OH, é a sililação que ocorre pela substituição dos hidrogênios ativos dos compostos pelos grupos trimetilsilila (–Si(CH₃)₃), denominados TMS (ZUO e ZHANG, 2005). O agente derivatizante comumente utilizado para sililação de estrogênios, devido ao seu baixo custo, é o N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (CF₃C=NSi(CH₃)₃OSi(CH₃)₃), também conhecido pela sigla BSTFA (SHAREEF *et al.*, 2006). Com o intuito de potencializar a eficiência da sililação, o produto comercial do BSTFA é apresentado também em combinação com o catalisador trimetilclorosilano (ClSi(CH₃)₃), denominado como TMCS (SHAREEF *et al.*, 2006).

Durante a sililação do estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol com BSTFA pode ocorrer a formação de três compostos 3-TMS-EE2, 17-TMS-EE2 e 3,17-di-TMS-EE2, resultando na detecção de compostos distintos por cromatografia gasosa. De acordo com ZUO e ZHANG (2005), a utilização de um solvente como a piridina juntamente com o BSTFA favorece a formação apenas de um produto de sililação, o 3,17-di-TMS-EE2. Além disso, a piridina é utilizada para facilitar a eficiência da reação e prevenir a hidrólise dos produtos formados (SHAREEF *et al.*, 2006).

A metodologia utilizada para derivatização foi a proposta por ZUO e ZHANG (2005) onde a amostra seca foi dissolvida com 50 μ L de piridina (pureza \geq 99,9%, Sigma-Aldrich) com posterior adição de 50 μ L de BSTFA/TMCS (99:1, Supelco Analytical), permanecendo por 30 min a 60 °C. No estudo realizado por SHAREEF *et al.* (2006), foram avaliados os efeitos da temperatura e do tempo de reação da derivatização. A conversão do TMS-EE2 para TMS-E1 ocorreu em alguns experimentos, sendo evitada com a utilização da piridina e em temperaturas menores que 75 °C. Os tempos de reação de derivatização de 30, 60 e 120 min não apresentaram resultados distintos entre si. Desta forma, a utilização da piridina juntamente com o agente derivatizante BSTFA/TMCS viabiliza a determinação concomitante dos estrogênios E1, E2 e EE2 por cromatografia gasosa.

Posteriormente, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e então transferidas para os *vials* com *insert* de 250 μ L (marca CRS) e, na sequência, analisadas em até 24 h após a etapa de derivatização.

A quantificação dos estrogênios foi realizada por cromatografia gasosa (CG) utilizando-se o equipamento *GC System 7890A*, acoplado a um detector por ionização

em chama (DIC) e equipado com injetor automático *Autosampler* 7693, todos da marca Agilent Technologies. A coluna DB-17ht, indicada para quantificação de estrogênios pelo fabricante, possui diâmetro de 0,25 mm, comprimento de 30 m e filme de espessura de 0,15 μm . A aquisição de dados e controle da análise foram realizados através do *software* da Agilent Technologies *GC ChemStation* (Rev. B.04.02[96]).

A metodologia proposta para determinação simultânea dos três estrogênios (E1, E2 e EE2) está detalhada na Tabela 4.6, sendo baseada na metodologia para E1 e E2 proposta por MACHERONE (2012), com diversas modificações. As curvas de calibração dos estrogênios E1, E2 e EE2 foram preparadas com dez pontos e concentrações na faixa de 0,5 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a partir de soluções padrão dos estrogênios em acetona.

Tabela 4.6: Condições de operação do sistema CG/DIC para quantificação simultânea dos estrogênios E1, E2 e EE2.

Injeção	Temperatura do injetor	180 °C		
	Volume de injeção	1 μL		
	Modo de injeção	<i>Split</i> (1:50)		
CG	Coluna	DB-17ht		
	Gás de arraste	H_2		
	Fluxo do gás de arraste	1,22 mL.min^{-1}		
	Rampa de aquecimento	-	180 °C	3 min
		10 °C.min ⁻¹	250 °C	-
2,5 °C.min ⁻¹		270 °C	-	
10 °C.min ⁻¹		300 °C	2 min	
Detector	Tipo	Ionização de chama (DIC)		
	Temperatura do detector	320 °C		
	Fluxo de H_2	30 mL.min^{-1}		

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da metodologia analítica para quantificação dos estrogênios por CG-DIC foram determinados de acordo com a Resolução nº 899/2003 (ANVISA, 2003), conforme apresentado nas Equações 4.1 e 4.2, respectivamente.

$$LD = \frac{3.DP_a}{IC} \quad (\text{Equação 4.1})$$

$$LQ = \frac{10.DP_a}{IC} \quad (\text{Equação 4.2})$$

onde: DP_a é o desvio padrão da intersecção com o eixo y de três curvas de calibração de cada estrogênio e IC é a inclinação da curva de calibração obtida.

A cada grupo de amostras analisadas, foram avaliados os resultados obtidos na injeção de padrões de estrogênio preparados independentemente dos padrões utilizados para as curvas de calibração. Após a análise de cada amostra, injetou-se um branco para evitar possíveis interferências nos resultados obtidos entre as amostras. A repetibilidade da análise cromatográfica foi verificada pela injeção em duplicata de cada amostra.

4.5 Balanço de massa dos estrogênios

Com o intuito de investigar o destino dos estrogênios E2 e EE2 no sistema MBBR, realizou-se o balanço de massa baseado nas metodologias propostas por SUAREZ *et al.* (2010) e LUO *et al.* (2014a). A adsorção na biomassa (aderida e em suspensão) e a biotransformação foram considerados como mecanismos de remoção destes compostos. A volatilização dos estrogênios através do *stripping* com o ar do sistema de aeração não foi considerado, com base nos baixos valores das constantes da lei de Henry de $1,5 \times 10^{-9}$ e $3,3 \times 10^{-10} \mu\text{g.m}^{-3}$ no ar/ $\mu\text{g.m}^{-3}$ no efluente para E2 e EE2, respectivamente (SUAREZ *et al.*, 2010).

A carga de cada estrogênio (representado por E_i) alimentada nos reatores biológicos ($L_{E_i,ENT}$ em μg) foi calculada conforme a Equação 1, apenas a partir da concentração de estrogênio na fase aquosa, já que não existiam sólidos em suspensão nos três efluentes sintéticos utilizados. A carga de estrogênio dissolvida que deixava os sistemas MBBR na fase aquosa ($L_{E_i,SAÍDA}$ em μg) foi calculada através da Equação 2.

$$L_{E_i,ENT} = Q.C_{E_i,ENT} \cdot \Delta t \quad (\text{Equação 1})$$

$$L_{E_i,SAÍDA} = Q.C_{E_i,SAÍDA}.\Delta t \quad (\text{Equação 2})$$

onde, Q é a vazão afluyente no sistema MBBR (em $L.d^{-1}$), $C_{E_i,ENT}$ e $C_{E_i,SAÍDA}$ são as concentrações médias de estrogênio no afluyente sintético e no efluyente final, respectivamente (em $\mu g.L^{-1}$), e Δt é o tempo de operação considerado para os cálculos (em d). Neste caso, utilizou-se um período de operação dos reatores biológicos de 80 d, sendo o início do período após 40 d da adição dos estrogênios (do dia 41 a 120, para o TRH de 12 h) e após 40 dias da alteração do TRH (do dia 161 a 240, para TRH de 8 h).

O equilíbrio de adsorção dos estrogênios na biomassa ocorre rapidamente em sistemas de tratamento biológico, sendo necessário um tempo de apenas alguns minutos até horas para ser estabelecido (REN *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2010; PETRIE *et al.*, 2014b). Pode-se considerar que o biofilme formado durante o longo período de estabilização dos reatores biológicos de 240 dias não possuía estrogênios adsorvidos, já que os substratos adicionados para o seu desenvolvimento não continham estes compostos. No período logo após a adição dos hormônios, ocorreu uma rápida adsorção destes compostos presentes na fase aquosa à biomassa aderida nos suportes. Por esta razão, no estado estacionário da operação contínua dos biorreatores, a contribuição da adsorção na remoção de estrogênios pode ser atribuída apenas à nova biomassa produzida, uma vez que teoricamente o equilíbrio da adsorção já foi atingido (JOSS *et al.*, 2005).

De acordo com REN *et al.* (2007), a adsorção dos estrogênios é predominantemente física devido às baixas energias de ligação, o que torna a dessorção uma possibilidade porém, como a taxa de dessorção é mais lenta do que a adsorção, esta pode ser desconsiderada. A adsorção dos estrogênios no material plástico dos suportes K1 também pode ser negligenciada, baseada nos experimentos realizados por FORREZ *et al.* (2009). Desta forma, a carga de estrogênios removida por adsorção à biomassa ($L_{E_i,ADS}$ em μg) pode ser calculada de acordo com a Equação 3, composta pelas contribuições dos sólidos em suspensão e da biomassa aderida.

$$L_{E_i,ADS} = Q.C_{E_i,SST}.SST.\Delta t + \Delta_{BIO}.C_{E_i,BIO} \quad (\text{Equação 3})$$

onde, $C_{E_i,SST}$ e $C_{E_i,BIO}$ são as concentrações dos estrogênios adsorvidos nos sólidos em suspensão e no biofilme (em $\mu g.g^{-1}$), respectivamente, apresentados na Tabela 5.6. SST

é a concentração média de sólidos suspensos totais no efluente final de cada reator (em mg.L^{-1}) e Δ_{BIO} é a diferença entre a biomassa aderida aos suportes plásticos (em g) no início e no final do período de operação de 80 dias considerado nos cálculos de cada TRH investigado.

O cálculo da carga de estrogênios correspondente a biotransformação ($L_{E_i,BIO}$ em μg) foi realizado pela Equação 4, entre as cargas de estrogênios: entrando no sistema, no efluente final e adsorvido no lodo.

$$\begin{aligned}
 L_{E_i,BIO} &= L_{E_i,ENT} - L_{E_i,SAÍDA} - L_{E_i,ADS} \\
 &= Q \cdot \Delta t \cdot (C_{E_i,ENT} - C_{E_i,SAÍDA} - C_{E_i,SST} \cdot SST) - \Delta_{BIO} \cdot C_{E_i,BIO} \quad (\text{Equação 4})
 \end{aligned}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Hidrodinâmica dos reatores biológicos

Conforme abordado no capítulo 4.1.1, a avaliação hidrodinâmica dos reatores MBBR aeróbios é importante para identificar possíveis zonas estagnadas e determinar as vazões de ar adequadas para a correta movimentação dos suportes. A partir de uma solução padrão com concentração do traçador salino de 160 g.L^{-1} , foi construída uma curva de calibração para relacionar a condutividade medida com a concentração de NaCl nos testes hidrodinâmicos dos reatores biológicos. Nos testes de mistura realizados para diferentes velocidades ascensionais de ar (U_G), os reatores biológicos MBBR apresentaram uma boa homogeneização, sem a formação de zonas estagnadas (resultados apresentados no Anexo B). A partir destes experimentos obtiveram-se os tempos de mistura (t_M), apresentados na Tabela 5.1, que correspondem a 95% da concentração máxima da solução do traçador salino registrada (valor de *plateau*). Na Figura 5.1 observam-se os perfis de variação do tempo de mistura com U_G para os três reatores biológicos investigados.

Tabela 5.1: Valores de tempo de mistura para distintas velocidades ascensionais de ar (U_G), para o reator autotrófico e para o reator heterotrófico.

MBBR-A		MBBR-H		MBBR-HA	
$U_G \text{ (m.h}^{-1}\text{)}$	$t_M \text{ (s)}$	$U_G \text{ (m.h}^{-1}\text{)}$	$t_M \text{ (s)}$	$U_G \text{ (m.h}^{-1}\text{)}$	$t_M \text{ (s)}$
15,1	25	15,8	30	14,9	25
18,0	20	18,8	20	18,4	20
20,9	15	21,5	15	21,3	15
22,4	15	23,3	15	22,8	15

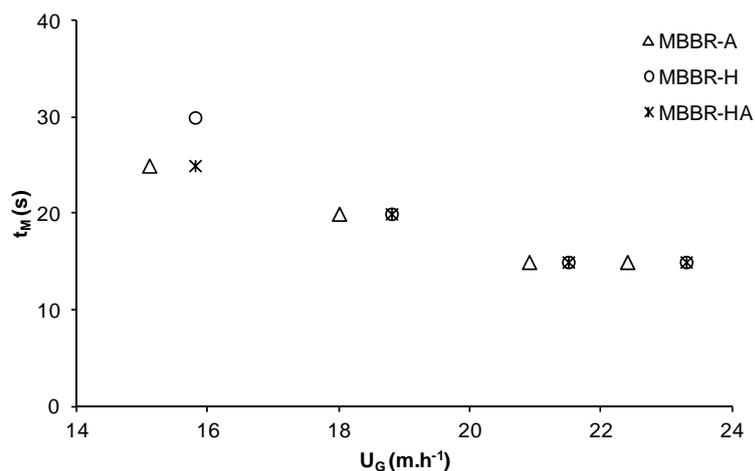


Figura 5.1: Perfil de variação dos tempos de mistura com U_G para os três sistemas MBBR.

Nos perfis apresentados na Figura 5.1, observa-se um decaimento de t_M com incrementos de U_G até um patamar, a partir do qual o tempo de mistura não diminui, sendo este valor característico de cada sistema reacional. O maior tempo de mistura obtido com a faixa de U_G investigada nos reatores biológicos foi de 30 s, que corresponde a 0,07% e 0,10% do TRH dos sistemas MBBR de 12 e 8 h, respectivamente. A partir destes resultados conclui-se que os reatores biológicos MBBR podem ser considerados de mistura perfeita na faixa de vazões de ar investigada. Desta forma, optou-se pela utilização das menores vazões de ar utilizadas de 15,1, 15,8 e 14,9 m.h⁻¹ para MBBR-A, MBBR-H e MBBR-HA, respectivamente.

5.2 Recuperação dos estrogênios

Os percentuais de recuperação de cada estrogênio isoladamente no processo de extração em fase sólida (EFS) das amostras líquidas e nas etapas de extração e limpeza das amostras sólidas foram determinados e estão apresentados nas Tabelas 5.2 e 5.3, respectivamente. Nas amostras líquidas adicionou-se concentrações de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dos estrogênios para avaliação das recuperações. Uma concentração de 0,10 $\mu\text{g.g}^{-1}$ foi adicionada às amostras de biofilme dos três reatores biológicos, extraídos durante o

período de estabilização, para obtenção dos percentuais de recuperação das etapas de extração e limpeza.

Tabela 5.2: Recuperação de estrogênios na EFS das amostras líquidas.

Estrogênios	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recuperação EFS (%)
Estrona	10	92,1 \pm 5,6
17 β -estradiol	10	97,3 \pm 4,9
17 α -etinilestradiol	10	94,0 \pm 3,8

Tabela 5.3: Recuperação de estrogênios nas etapas de extração e de limpeza das amostras sólidas.

Estrogênios	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Recuperação (%)
Estrona	0,10	80,1 \pm 9,6
17 β -estradiol	0,10	85,3 \pm 6,3
17 α -etinilestradiol	0,10	84,5 \pm 7,2

As recuperações da EFS das amostras líquidas com as duas concentrações investigadas apresentaram resultados estatisticamente semelhantes. Em ambos os casos, com amostras líquidas e sólidas, as recuperações obtidas encontraram-se na faixa ampla que é encontrada na literatura com valores de 61,1 a 125% (GOMES *et al.*, 2004; MARTI e BATISTA, 2014), devido as distintas metodologias de extração e/ou limpeza utilizadas entre os trabalhos, bem como o efeito das matrizes e suas características físico-químicas. As concentrações finais dos estrogênios apresentadas nesta tese foram

calculadas utilizando-se as recuperações apresentadas nas Tabelas 5.2 e 5.3 para as amostras líquidas e sólidas, respectivamente.

5.3 Cromatografia Gasosa

As curvas de calibração obtidas para 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona estão apresentadas nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente, com as respectivas equações das regressões lineares e coeficientes de correlação. A metodologia de quantificação dos estrogênios por cromatografia gasosa resultou em curvas de calibração com boa linearidade na faixa de concentrações investigada, com coeficientes de correlação (R^2) superiores a 0,99, de acordo com o que preconiza a ANVISA na Resolução nº 899 de 2003 (ANVISA, 2003). A repetibilidade dos resultados foi confirmada pela análise das amostras de duplicata onde se quantificaram desvios padrão na faixa de 2 a 20% na análise dos estrogênios.

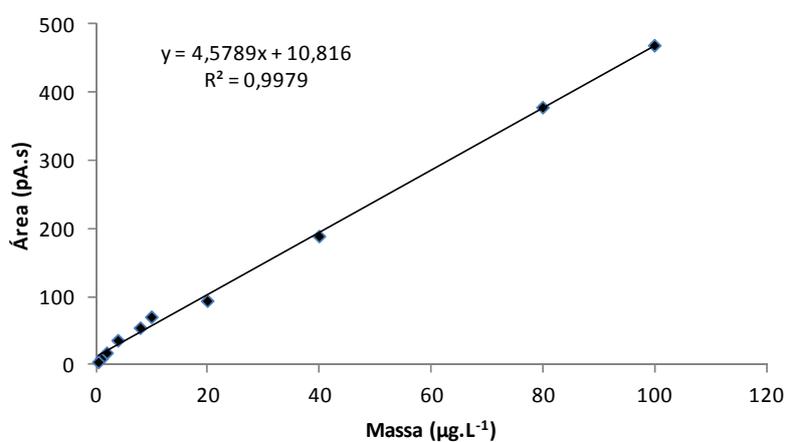


Figura 5.2: Curva de calibração do 17 β -estradiol (E2).

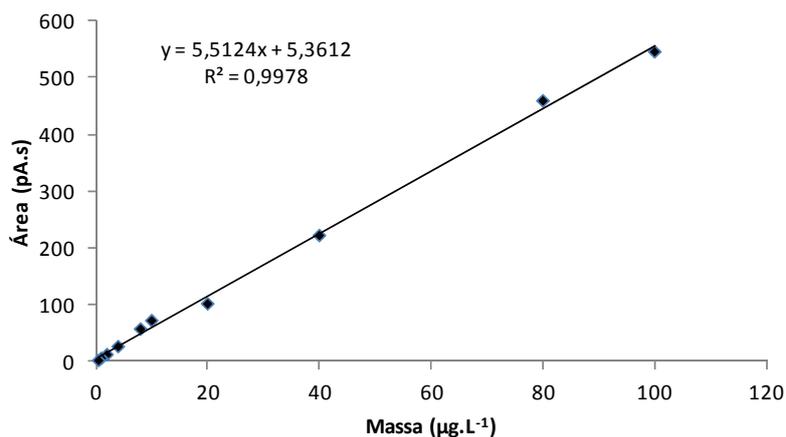


Figura 5.3: Curva de calibração do 17 α -etinilestradiol (EE2).

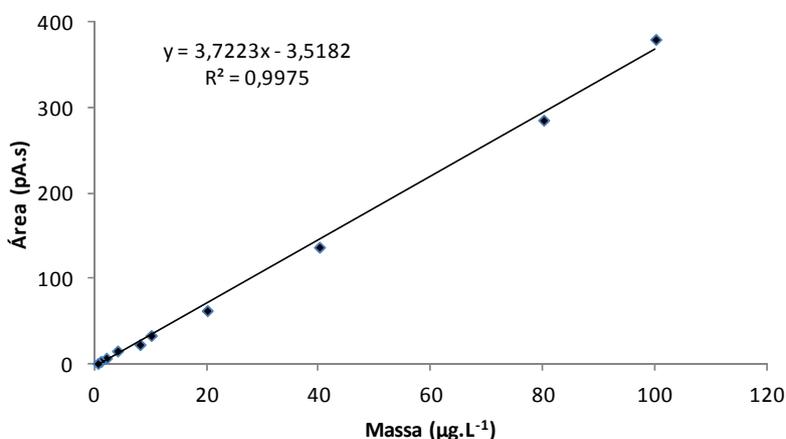


Figura 5.4: Curva de calibração da estrona (E1).

O cromatograma apresentado na Figura 5.5 é referente à injeção de uma amostra composta de 50 μ L de BSTFA + 1% TMCS e 50 μ L de piridina, utilizados como composto derivatizante e solvente, respectivamente, na determinação dos estrogênios. Observa-se que os reagentes e seus subprodutos apresentaram alta volatilidade devido aos picos cromatográficos com baixo tempo de retenção (entre 1,2 e 1,4 min), o que não interferiu na quantificação dos estrogênios.

Análises dos três efluentes sintéticos sem e com a adição dos estrogênios foram realizadas com o intuito de averiguar possíveis interferências das matrizes aquosas na determinação e quantificação dos estrogênios (Figuras 5.6 a 5.8). Além disso, averiguou-se a eficácia dos processos de concentração e limpeza pela utilização de 1 L das matrizes nas análises sem estrogênios e 250 mL das matrizes com estrogênio. Conforme observado nos cromatogramas apresentados nas Figuras 5.6 a 5.8, pode-se

observar que a utilização de um volume menor das amostras na etapa de EFS auxiliou na quantificação dos estrogênios devido a menor interferência dos compostos presentes nas matrizes. Desta forma, evidenciou-se que as etapas de pré-tratamento das amostras foram suficientes para análise dos compostos em questão, sem a necessidade de etapas adicionais de limpeza. Os tempos de retenção dos estrogênios obtidos na metodologia utilizada foram de 11,75 min (E2), 13,25 min (EE2) e 13,4 min (E1).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos estrogênios investigados nesta tese, determinados de acordo com a Resolução nº 899 da ANVISA (2003), estão apresentados na Tabela 5.4.

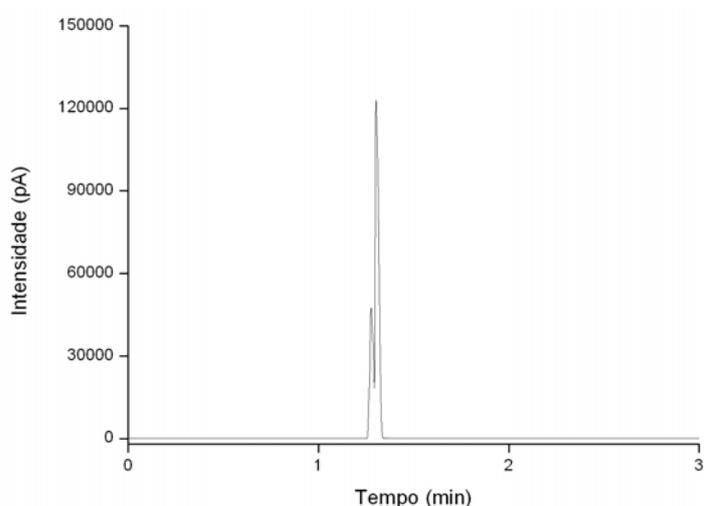


Figura 5.5: Cromatograma do BSTFA + 1% TMCS e da piridina.

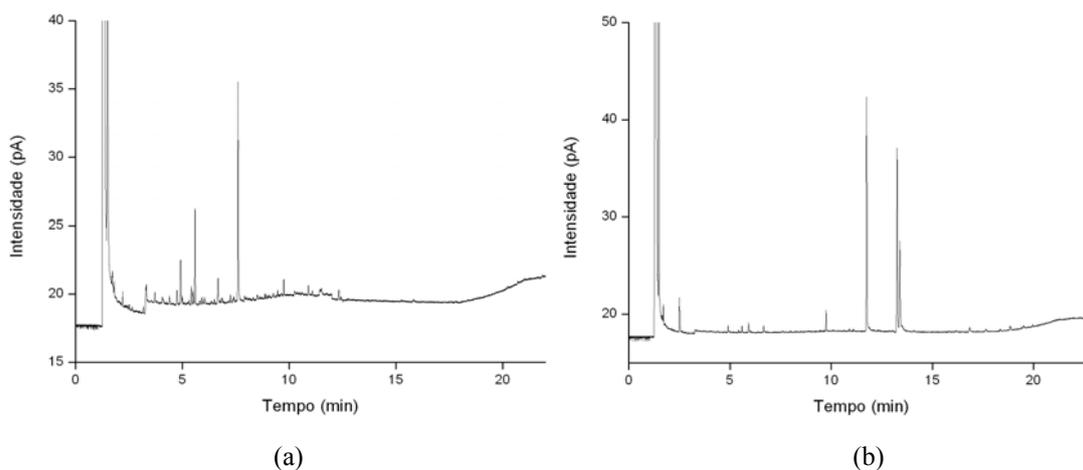


Figura 5.6: Efeito do efluente sintético autotrófico (a) sem estrogênio e (b) com estrogênio na quantificação dos estrogênios pela metodologia proposta.

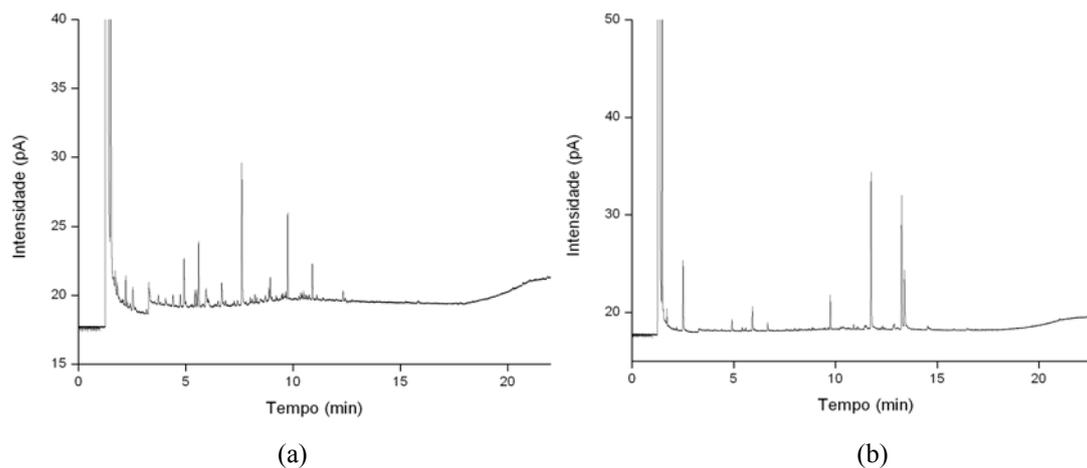


Figura 5.7: Efeito do efluente sintético heterotrófico (a) sem estrogênio e (b) com estrogênio na quantificação dos estrogênios pela metodologia proposta.

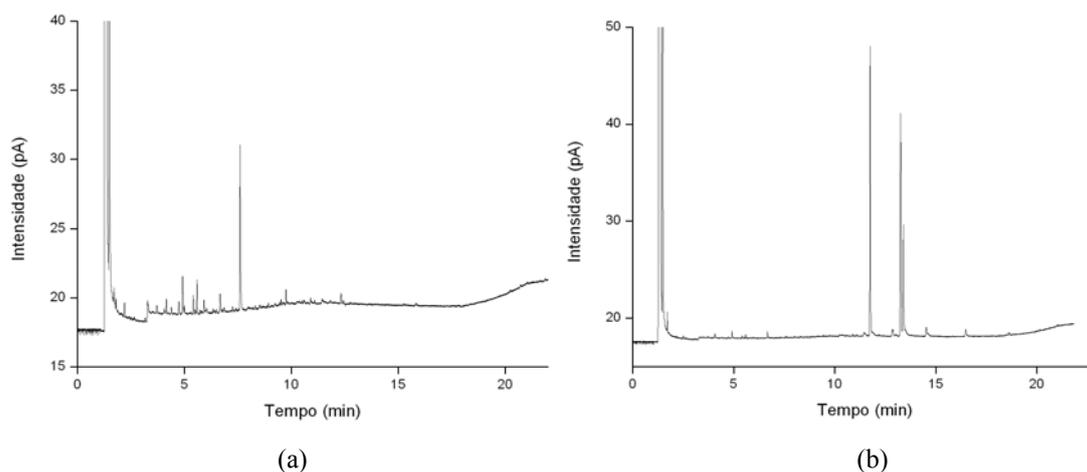


Figura 5.8: Efeito do efluente sintético heterotrófico/autotrófico (a) sem estrogênio e (b) com estrogênio na quantificação dos estrogênios pela metodologia proposta.

Tabela 5.4: Limites de detecção e quantificação dos estrogênios para a metodologia analítica utilizada.

Estrogênio	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
E1	0,04	0,14
E2	0,04	0,12
EE2	0,03	0,10

5.4 Período de estabilização dos reatores biológicos

A partida dos reatores biológicos ocorreu pela adição de inóculo proveniente do reciclo de lodo do sistema de lodos ativados da ETE Alegria (CEDAE). Inicialmente, os sistemas MBBR foram alimentados com os distintos efluentes sintéticos na ausência dos estrogênios, para que o biofilme se desenvolvesse nos suportes e os sistemas reacionais atingissem o estado estacionário de operação. Durante o período de *start-up* e posterior estabilização dos reatores biológicos, os sistemas MBBR operaram com TRH de 12 h durante oito meses, apresentando operações estáveis e atingindo eficiências de remoção de matéria orgânica e nitrogênio amoniacal conforme apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Resultados dos sistemas MBBR durante os 240 dias do período de estabilização em relação à DQO e N-NH₄⁺.

Parâmetro	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
Carga orgânica (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	-	0,80	0,80
DQO SAÍDA (mg.L ⁻¹)	-	20,8 ± 4,4	24,7 ± 4,7
Remoção de DQO (%)	-	94,8 ± 1,1%	93,9 ± 1,2%
Carga de nitrogênio (kg N-NH ₄ ⁺ .m ⁻³ .d ⁻¹)	0,20	0,04	0,10
N-NH ₄ ⁺ SAÍDA (mg.L ⁻¹)	16,4 ± 3,8	-	7,8 ± 2,0
Remoção de N-NH ₄ ⁺ (%)	84,0 ± 3,7%	-	84,4 ± 4,1%

Na Tabela 5.5 também estão detalhadas as cargas orgânicas e de nitrogênio amoniacal aplicadas em cada reator biológico durante o período de estabilização. Nota-se que os valores de carga orgânica de 0,80 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ são similares ao que é aplicado em sistemas de lodos ativados de ETE com aeração prolongada (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). Apesar dos valores de DQO em torno de 400 mg.L⁻¹ dos efluentes sintéticos dos sistemas MBBR-H e MBBR-HA (valor típico de esgoto sanitário com carga orgânica média (JORDÃO e PESSÔA, 2009)), estes valores de carga orgânica relativamente baixos se devem ao elevado TRH utilizado nesta tese (12 h) para obtenção de uma melhor eficiência de remoção dos estrogênios.

O mesmo ocorreu para as cargas de nitrogênio amoniacal, cujos valores foram de 0,20, 0,04 e 0,10 kg N-NH₄⁺.m⁻³.d⁻¹ para MBBR-A, MBBR-H e MBBR-HA, respectivamente. Utilizaram-se concentrações de N-NH₄⁺ na alimentação do MBBR-H e

do MBBR-HA de 20 e 50 mg.L⁻¹, respectivamente, referentes aos valores de esgoto médio e forte em relação a este parâmetro (JORDÃO e PESSÔA, 2009). No sistema MBBR-A a concentração de N-NH₄⁺ no efluente sintético foi de 100 mg.L⁻¹.

No que diz respeito à nitrificação no MBBR-A e no MBBR-HA, o íon nitrito não foi detectado nos efluentes provenientes dos reatores (< LQ), indicando que este foi consumido na segunda etapa do processo de nitrificação, com geração do íon nitrato. Quantificou-se as concentrações de nitrato nos efluentes sintéticos, cujos valores sempre foram inferiores que o limite de quantificação (< 0,07 mg.L⁻¹), e na saída os valores médios observados foram de 140 ± 22 mg.L⁻¹ e de 10,1 ± 2,5 mg.L⁻¹ para o MBBR-A e o MBBR-HA, respectivamente. No efluente proveniente do sistema MBBR-H foram realizadas as análises para quantificação de nitrito e nitrato, cujos valores foram sempre inferiores aos limites de quantificação de 0,06 e 0,07 mg.L⁻¹, respectivamente, confirmando a não ocorrência da nitrificação neste reator pela adição do inibidor ATU.

Os valores de pH nos reatores biológicos foram mantidos na faixa de 6,5 a 7,0, de acordo com os valores preconizados na literatura para um melhor desenvolvimento da maioria das bactérias presentes em sistemas de tratamento biológico de efluentes (TCHOBANOGLOUS e BURTON, 1991). A queda do pH decorrente da oxidação da amônia com liberação de íons H⁺ foi controlada pelo ajuste da alcalinidade do efluente sintético através da adição de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Este fato foi mais impactante no MBBR-A, onde uma maior carga de nitrogênio amoniacal foi alimentada no reator biológico. Com o intuito de averiguar o efeito da nitrificação na possível queda do pH, realizou-se um acompanhamento do consumo da alcalinidade total nos reatores biológicos ao longo da operação dos sistemas no início do período de estabilização. De acordo com a literatura (GERARDI, 2002), estima-se que 7,1 kg de alcalinidade (CaCO₃) são consumidos por cada kg de N-NH₄⁺ oxidado e, a partir deste valor, ajustou-se a alcalinidade total dos efluentes sintéticos.

Os reatores biológicos operaram sem nenhum controle de temperatura, cuja média de temperatura ambiente foi de 23,6 ± 2,7 °C nos três sistemas investigados ao longo do período de operação. As faixas de concentração de SST observadas nos efluentes finais produzidos pelos reatores MBBR-A, MBBR-H e MBBR-HA ao longo do período de estabilização foram de 10,5 a 17,6, 13,0 a 32,7 e 15,2 a 25,7 mg.L⁻¹, respectivamente.

Todos os resultados das análises dos afluentes e efluentes dos três sistemas MBBR do período de estabilização encontram-se detalhados no Anexo C.

5.5 Alterações nos reatores biológicos após a adição dos estrogênicos

Durante os primeiros 40 dias após a adição dos estrogênicos aos reatores biológicos, algumas modificações importantes foram observadas. No MBBR-A operando com TRH de 12 h ocorreu uma redução acentuada na eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal e, conseqüentemente, um decréscimo da taxa de remoção de N-NH_4^+ de 0,69 para $0,16 \text{ g N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ (Figura 5.9). A remoção do nitrogênio amoniacal apresentou comportamento similar no MBBR-A com TRH de 8 h, entretanto, a queda de eficiência foi menos acentuada. O efeito deletério na nitrificação ocorreu possivelmente em decorrência da toxicidade da corrente de estrogênicos na comunidade microbiana e a maior sensibilidade das bactérias nitrificantes às alterações nas condições operacionais, incluindo a presença de compostos tóxicos (JULIASTUTI *et al.*, 2003).

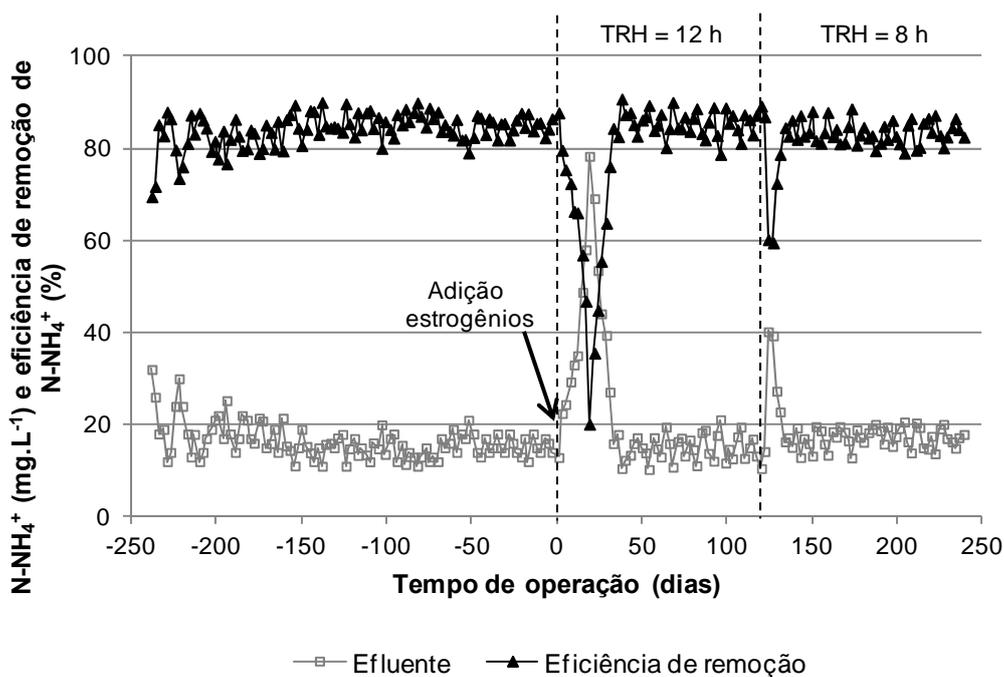


Figura 5.9: Efeito dos estrogênicos na nitrificação do MBBR-A.

Analisando os perfis de concentração de nitrito e nitrato no efluente produzido pelo MBBR-A (Figura 5.10) observa-se que o efeito de inibição na nitrificação também pode ser evidenciado pela queda na produção do íon nitrato. Os valores de nitrito foram menores que o LQ em quase a totalidade do período de operação, exceto no período inicial da estabilização e após a adição dos estrogênicos no qual os valores chegaram a

75 mg.L⁻¹. Desta forma, conclui-se que as bactérias responsáveis pela segunda etapa da nitrificação, a nitratação, é que sofreram a inibição com a adição dos estrogênios. Entretanto, após a diminuição do TRH do reator biológico não se observou um aumento na concentração dos íons nitrito.

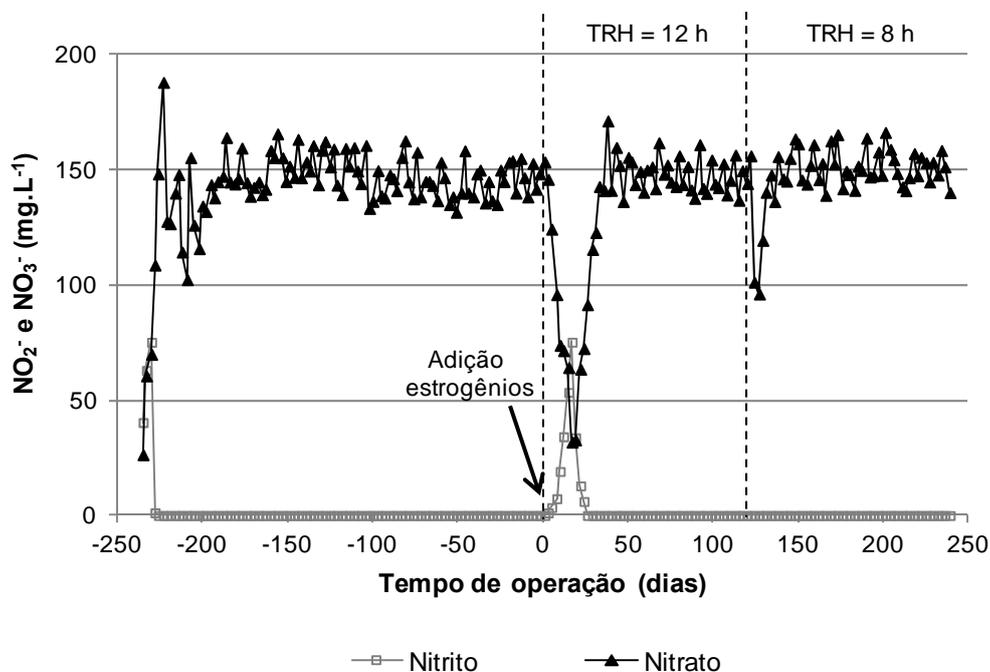


Figura 5.10: Perfil de concentração dos íons nitrito e nitrato no MBBR-A.

Outro efeito adverso observado após a adição dos estrogênios foi um crescimento intenso na concentração de sólidos em suspensão nos três sistemas MBBR, conforme evidenciado nas Figuras 5.11 e 5.12 pelas concentrações de SST e SSV, respectivamente. Devido a grande similaridade entre as concentrações dos sólidos em suspensão totais e voláteis de cada amostra, conclui-se que praticamente a totalidade dos sólidos em suspensão é proveniente da superprodução de exopolímeros (EPS), ou seja, de origem orgânica. Apesar das elevadas concentrações de sólidos em suspensão nos efluentes produzidos pelos três sistemas reacionais (170 – 305 mg.L⁻¹ e 240 – 410 mg.L⁻¹ para os TRH de 12 e 8 h, respectivamente), os lodos biológicos apresentaram boa sedimentabilidade. Este fato pode ser evidenciado pelo perfil de turbidez das amostras após uma rápida sedimentação de 10 min, conforme apresentado na Figura 5.13. A exceção ocorreu no período logo após a adição dos estrogênios, onde os valores de turbidez foram levemente superiores.

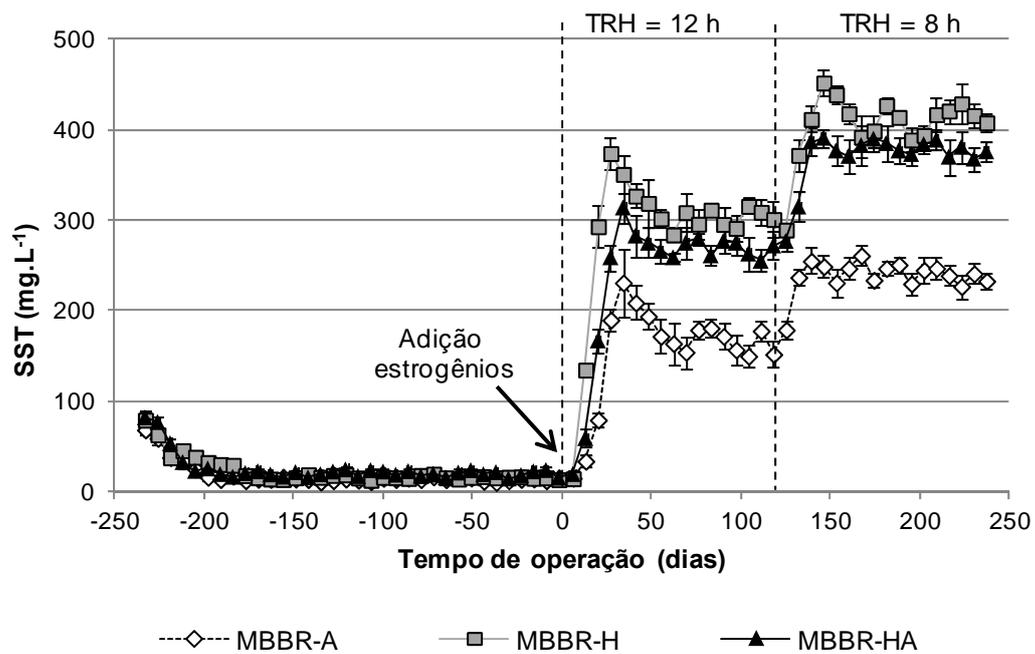


Figura 5.11: Perfis de concentração de SST dos três sistemas MBBR.

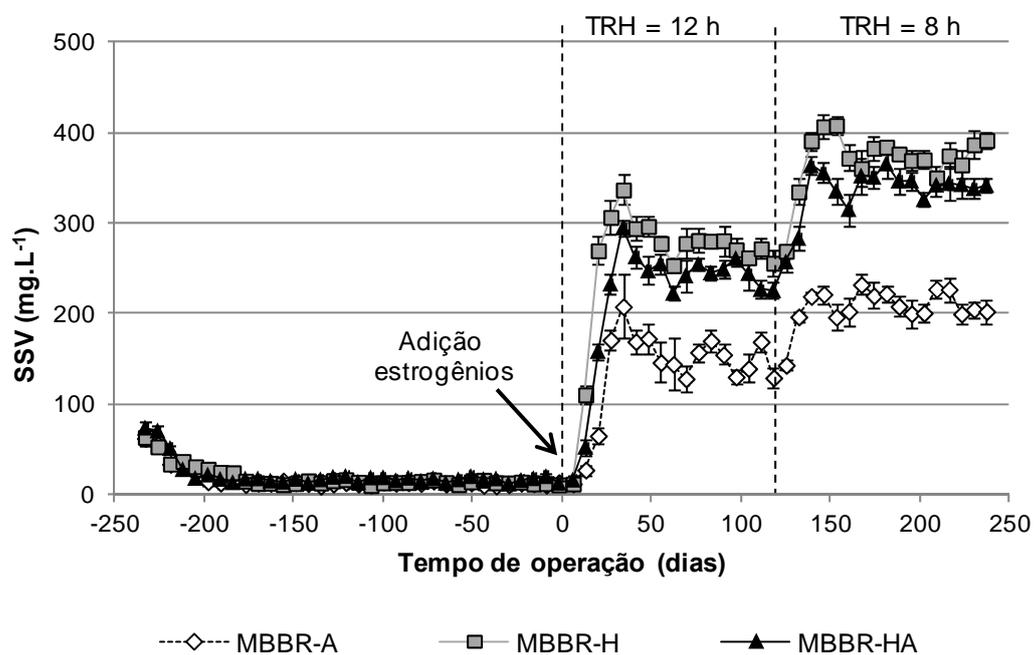


Figura 5.12: Perfis de concentração de SSV dos três sistemas MBBR.

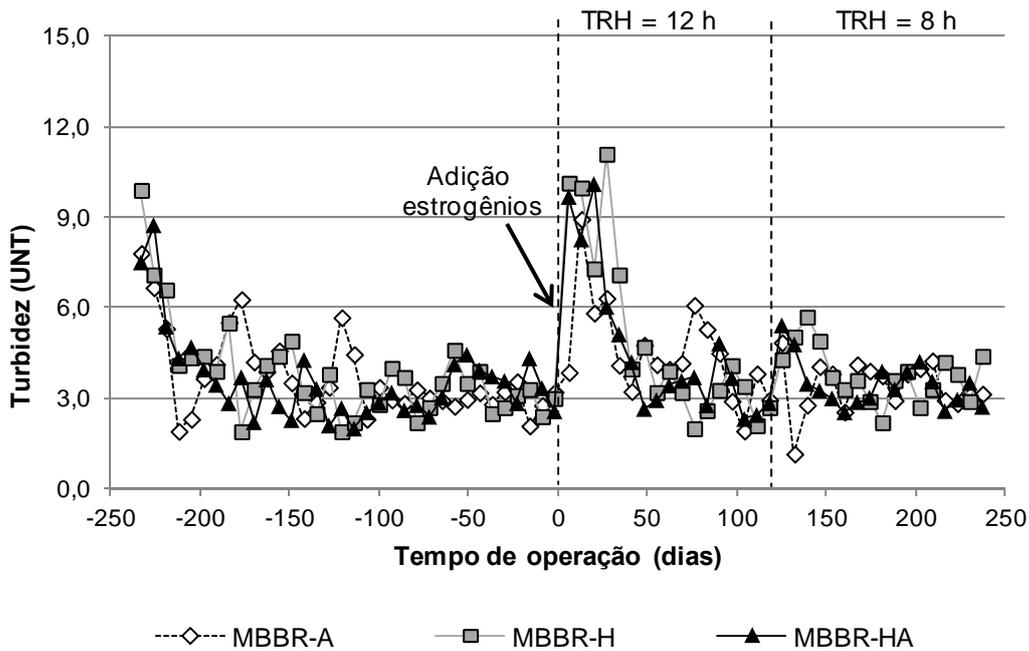


Figura 5.13: Valores de turbidez dos sobrenadantes dos efluentes dos sistemas MBBR após sedimentação por 10 min.

Além do incremento nas concentrações de sólidos em suspensão, a quantidade de biofilme nos suportes plásticos também aumentou, conforme apresentado na Figura 5.14 com os valores de biomassa aderida, calculada em base seca para todo o volume dos reatores. Os principais componentes do lodo que envolve os agregados microbianos em biofilmes e flocos em suspensão são as substâncias poliméricas extracelulares, também denominadas de expolímeros (EPS). Um grande número de polímeros compõe a matriz de EPS, onde a maior proporção é atribuída a polissacarídeos e proteínas, enquanto que ácidos nucleicos e lipídeos são encontrados em menores quantidades (FLEMMING e WINGENDER, 2010; SHENG *et al.*, 2010). Para evidenciar a superprodução de EPS, nas Figuras 5.15 e 5.16 estão apresentados os perfis de concentrações de polissacarídeos totais (PS) e proteínas totais (PT) da biomassa aderida dos três sistemas MBBR.

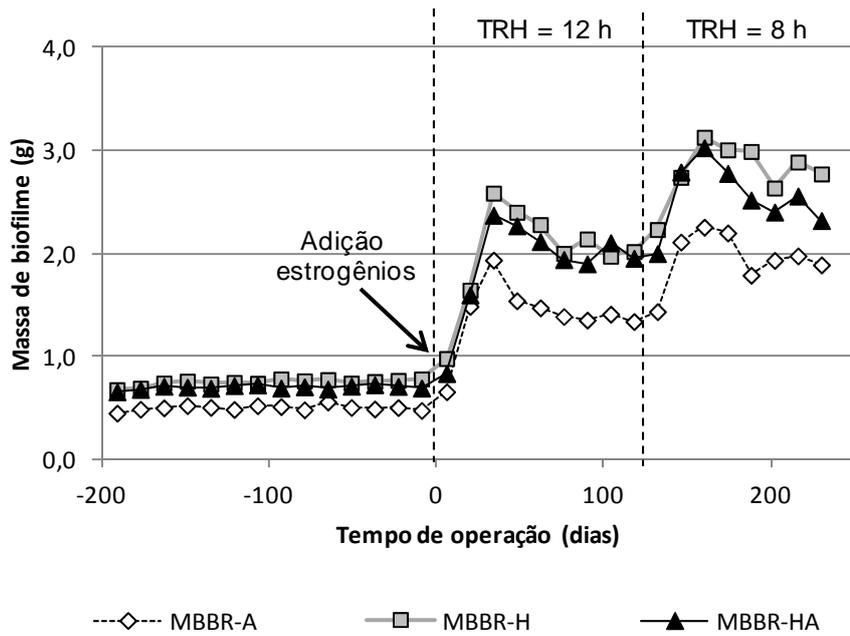


Figura 5.14: Massa de biofilme aderido aos suportes dos sistemas MBBR (base seca).

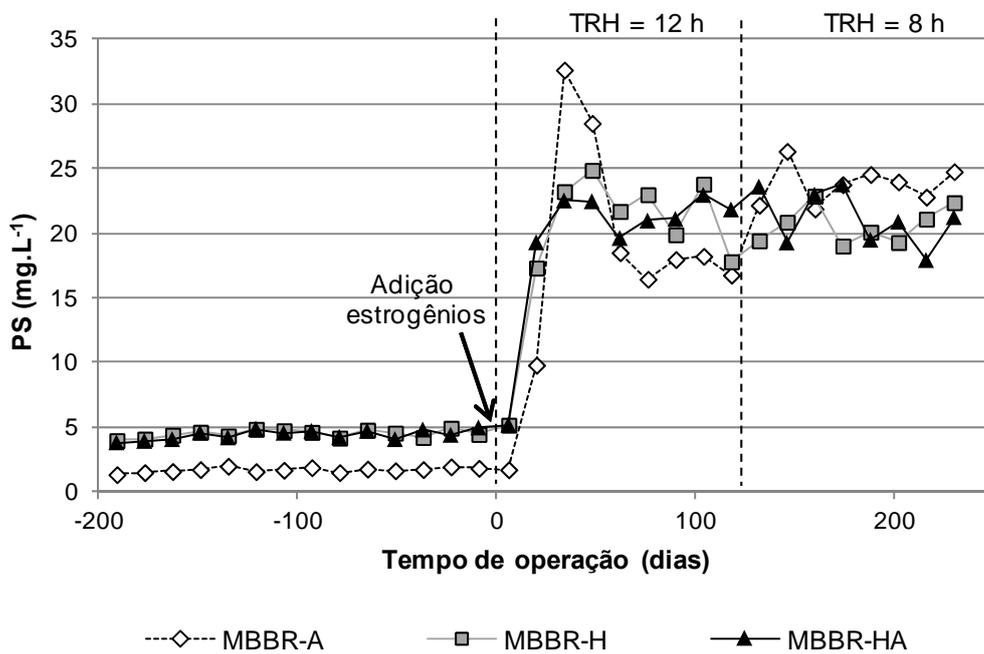


Figura 5.15: Perfil de concentração de polissacarídeos totais no biofilme dos sistemas MBBR investigados.

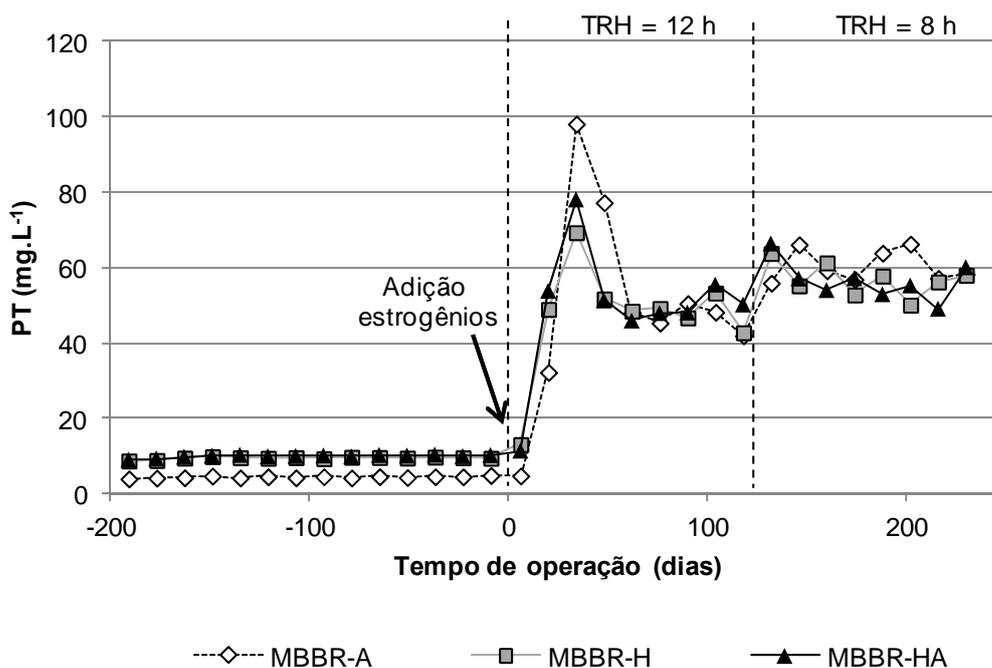


Figura 5.16: Perfil de concentração de proteínas totais no biofilme dos sistemas MBBR investigados.

A concentração e a composição dos exopolímeros (em termos de PS e PT) estão diretamente relacionadas com a composição do efluente, temperatura, forças de cisalhamento e a comunidade microbiana presente (FLEMMING e WINGENDER, 2010). Uma resposta natural dos micro-organismos à exposição a condições ambientais desfavoráveis é a estimulação da produção de EPS, sendo um indicador da sensibilidade dos micro-organismos a estas alterações (AVELLA *et al.*, 2010). Uma das funções dos EPS é atuar na comunidade microbiana como uma barreira contra a presença de compostos tóxicos, atrasando ou evitando o contato com estes compostos devido às limitações difusionais e/ou a ação de enzimas (FLEMMING e WINGENDER, 2010).

Na investigação de YANG e LI (2009), um comportamento similar foi evidenciado durante o período de transição inicial após a imposição de uma condição de estresse ao sistema de lodos ativados. Inicialmente, os autores observaram um aumento intenso na produção de EPS atingindo concentrações elevadas, com subsequente redução após a aclimatação dos micro-organismos às novas condições operacionais. No presente trabalho, esta variabilidade foi mais evidente no sistema MBBR enriquecido com bactérias nitrificantes (MBBR-A), onde a atividade biológica foi afetada com a redução da taxa de remoção de nitrogênio amoniacal. PASQUINI *et al.* (2013)

estudaram o efeito de alguns micropoluentes com distintas concentrações no comportamento microbiano de sistema de lodos ativados. Os autores observaram que com todos os compostos em concentrações elevadas houve um aumento da produção de EPS, sendo esta uma reação de proteção para manutenção da integridade funcional dos micro-organismos.

Apesar do aumento ocorrido nas concentrações de proteínas e polissacarídeos totais após a adição dos estrogênios, a razão entre as suas concentrações (PT/PS) permaneceu praticamente inalterada ao longo de toda a operação com valores médios de $2,7 \pm 0,2$ (MBBR-A), $2,4 \pm 0,3$ (MBBR-H) e $2,4 \pm 0,3$ (MBBR-HA). Na Figura 5.17 evidencia-se que houve um aumento gradual desta razão média com a adição dos estrogênios e posteriormente com a diminuição do TRH. Esta variabilidade pode ser melhor visualizada na Figura 5.18, onde estão apresentados os perfis da razão PT/PS para os três reatores biológicos investigados ao longo dos 480 dias de operação.

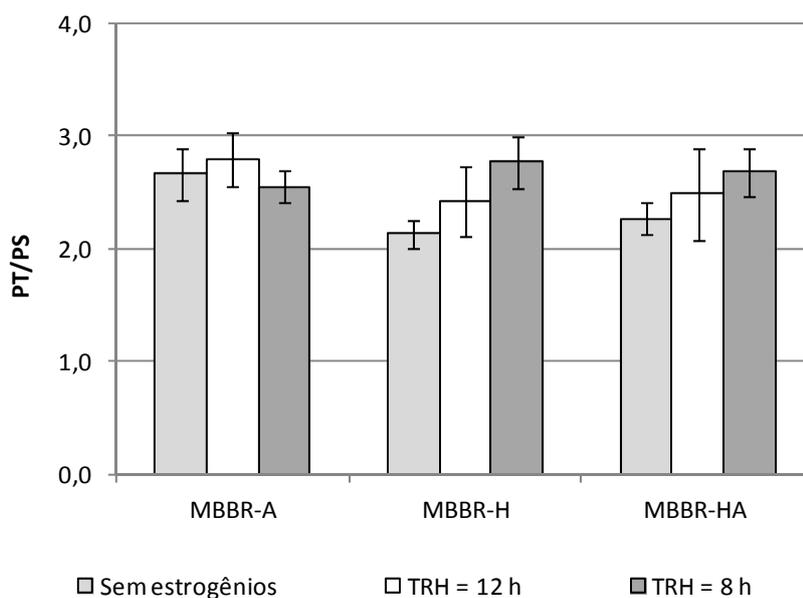


Figura 5.17: Valores médios da razão PT/PS dos três sistemas MBBR nas condições operacionais investigadas.

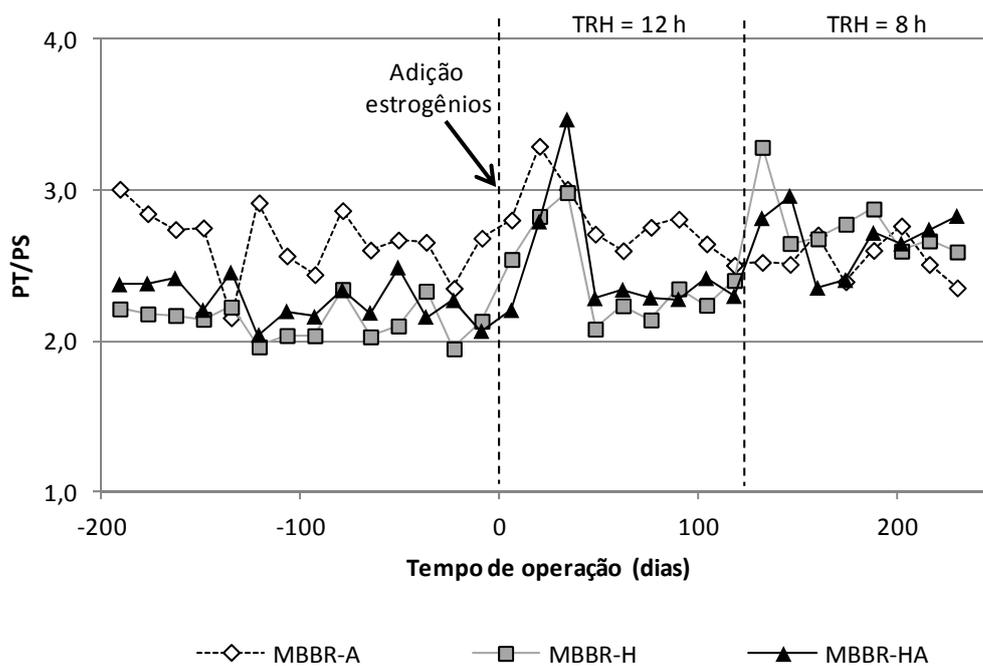


Figura 5.18: Variação da razão PT/PS nos três sistemas MBBR investigados.

As razões PT/PS calculadas nesta tese estão de acordo com o que foi exposto por SHENG *et al.* (2010), onde foi reportado que os micro-organismos produziram exopolímeros com maior proporção de proteínas do que polissacarídeos sob condições de estresse. Entretanto, resultados opostos foram observados na investigação de SPONZA (2003) em distintas estações de tratamento de efluente industrial e de esgoto operando sob condições de estresse, onde as razões de PT/PS foram menores do que 1,0. Alguns autores têm relatado na literatura o efeito das condições ambientais na composição dos exopolímeros produzidos pelos micro-organismos, incluindo situações de estresse como cargas de choque, toxicidade, temperatura, entre outros (BRANDA *et al.*, 2005). Isto exemplifica a complexidade dos fatores que afetam a produção de EPS e, conseqüentemente, o desenvolvimento e a manutenção da microbiota no biofilme.

Na presente tese, apenas os parâmetros de PS e PT da biomassa foram determinados por causa da complexidade da matriz que forma o agregado microbiano dos biofilmes. De acordo com o que foi apresentado na revisão feita por KUNACHEVA e STUCKEY (2014), poucos pesquisadores têm focado seus estudos na identificação detalhada das substâncias que constituem os EPS e os produtos microbianos solúveis (PMS) devido à complexidade analítica, principalmente no que tange o pré-tratamento

das amostras, além da heterogeneidade estrutural e propriedades funcionais complexas dos biofilmes (RAS *et al.*, 2011).

Em relação aos resultados de matéria orgânica, após a adição da corrente de estrogênios e consequente aumento na produção de EPS, observou-se um gradual incremento nas concentrações de DQO solúvel (DQO_s) nos efluentes produzidos pelos sistemas MBBR, conforme apresentado na Figura 5.19. Ambos os reatores que receberam carga orgânica carbonácea apresentaram variações similares na DQO solúvel, como era esperado, já que a carga orgânica aplicada foi a mesma. De acordo com MORGAN-SAGASTUME e ALLEN (2005), em sistemas com operação contínua pode ocorrer a solubilização, gerando os produtos microbianos solúveis (PMS), com consequente decréscimo na qualidade do efluente produzido, principalmente no que diz respeito à matéria orgânica solúvel. Nos casos em que há a presença de compostos que apresentem toxicidade ou quando ocorrem alterações bruscas na alimentação do reator biológico, a produção de PMS pode elevar a DQO do efluente final em até 17% a mais do que a DQO do afluente (KUNACHEVA e STUCKEY, 2014).

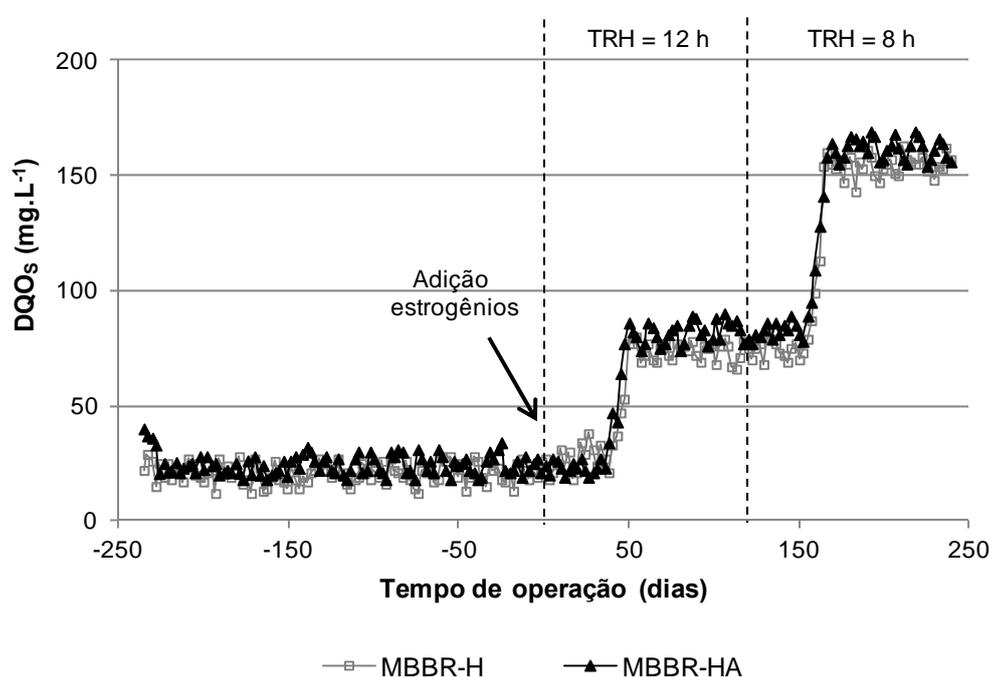


Figura 5.19: Perfis de concentração de DQO_s nos sistemas MBBR-H e MBBR-HA.

Através das observações no microscópio óptico identificou-se que possivelmente ocorreu um aumento do número de bactérias filamentosas presentes no biofilme aderido

aos suportes após a adição dos estrogênios, conforme apresentado nas microfotografias da Figura 5.20. Este efeito foi mais evidente nos reatores biológicos com adição de carga orgânica carbonácea, ou seja, nos sistemas MBBR-H e MBBR-HA.

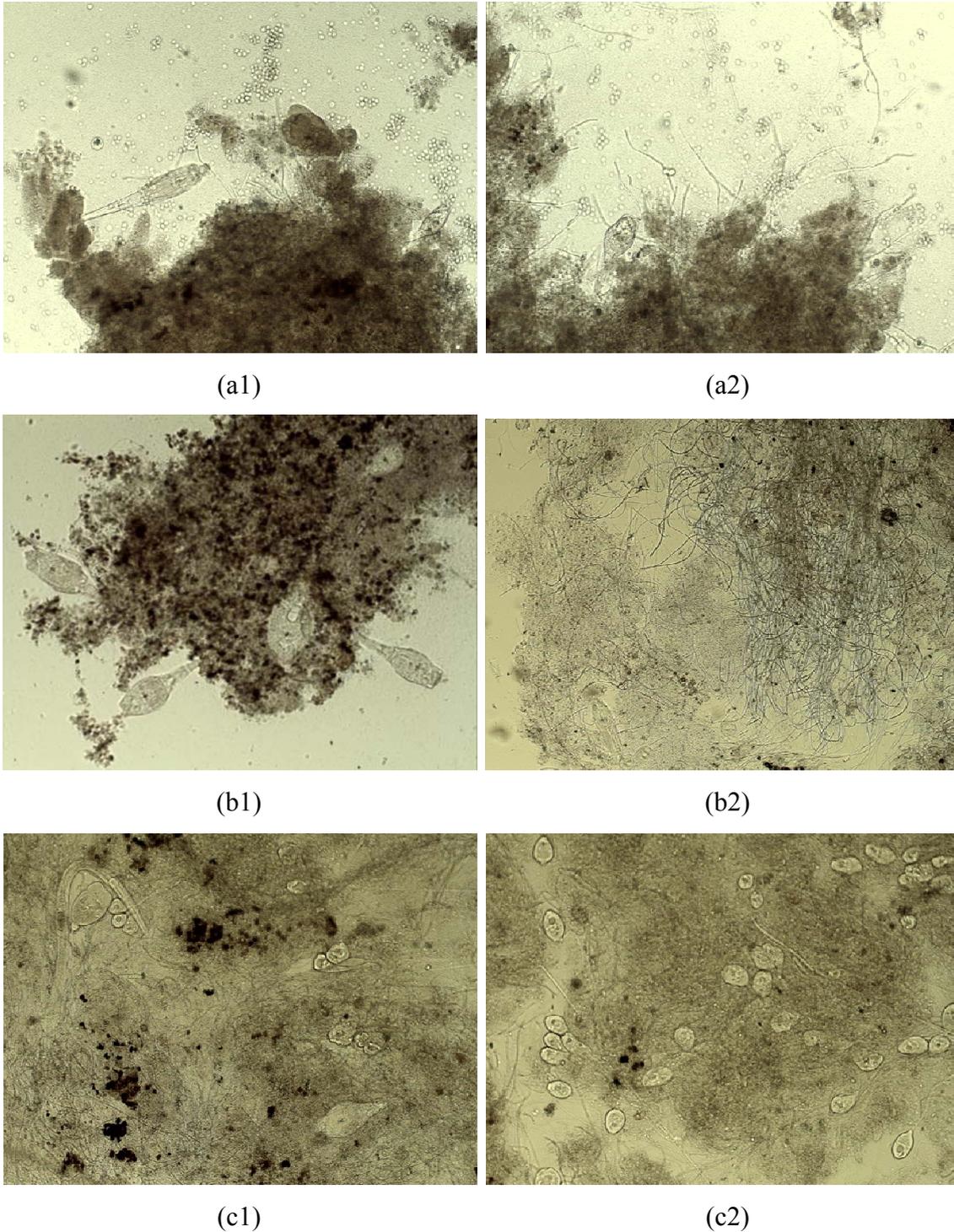


Figura 5.20: Microfotografias da biomassa aderida nos sistemas (a) MBBR-A, (b) MBBR-H e (c) MBBR-HA durante (1) o período de estabilização e (2) TRH de 8 h (aumento de 10x).

Diversos fatores podem resultar no crescimento intensivo de bactérias filamentosas em sistemas de tratamento biológico. Entretanto, os dados apresentados na literatura estão relacionados normalmente a sistemas de lodos ativados, e não a sistemas com biomassa aderida. Nestes casos, as condições operacionais e as características do efluente são as principais causas relacionadas com a abundância de micro-organismos filamentosos. De acordo com SANT'ANNA JUNIOR (2010), podem-se destacar como responsáveis pelo *bulking* filamentoso a relação entre alimento e biomassa (A/M), a deficiência de nutrientes e a falta de oxigênio dissolvido (OD). O parâmetro A/M é utilizado em sistemas de lodos ativados, não existindo um parâmetro correspondente para sistemas com biofilme. Nos três sistemas MBBR não houve ausência de nutrientes nem de oxigênio dissolvido, que foi mantido acima de 4 mg.L⁻¹ dentro do meio reacional. Entretanto, acredita-se que a elevada produção de EPS pode ter resultado em problemas na difusão do OD até as regiões mais profundas do biofilme, ocasionando assim a produção excessiva de bactérias filamentosas.

O efeito de substâncias tóxicas presentes em efluentes industriais têm demonstrado inicialmente a redução na quantidade de micro-organismos de níveis tróficos superiores em sistemas de tratamento biológico (SANT'ANNA JUNIOR, 2010). Apesar do efeito temporário de inibição parcial da nitrificação no MBBR-A, não se observou nenhuma alteração visual significativa no número destes micro-organismos como rotíferos e outros protozoários presentes no biofilme.

É importante ressaltar a vantagem dos sistemas de tratamento biológico com biofilme na retenção de micro-organismos com crescimento lento, como as bactérias nitrificantes. Um problema normalmente relatado em sistemas de biomassa em suspensão com nitrificação é a dificuldade de prevenção do arraste destas bactérias para fora do sistema reacional (RAS *et al.*, 2011). A produção de EPS, apesar de ter proporcionado alguns efeitos adversos nos sistemas MBBR investigados, é de primordial importância nos biofilmes pela formação de um ambiente estável para o desenvolvimento dos micro-organismos e atuando como uma barreira contra as mudanças externas.

Outro fato que deve ser levado em consideração é que as concentrações de estrogênios adicionadas aos efluentes sintéticos na presente tese foram superiores aos normalmente encontrados em esgoto sanitário. Desta forma, os efeitos adversos descritos anteriormente podem não ocorrer em ETEs reais ou ocorrer em uma proporção inferior a observada nos três sistemas MBBR investigados. Apesar destas flutuações

iniciais, os reatores biológicos apresentaram uma operação estável em ambos TRH investigados. Todos os resultados das análises dos afluentes e efluentes dos três sistemas MBBR do período após a adição dos estrogênios encontram-se detalhados no Anexo D.

5.6 Adsorção dos estrogênios na biomassa

A adsorção pode ser considerada como a primeira etapa na remoção de desreguladores endócrinos, como os estrogênios, em estações de tratamento de esgoto. Entretanto, é importante ressaltar que um aumento na quantidade de estrogênio adsorvido na biomassa não representa ou resulta em uma maior biodegradação destes compostos (PETRIE *et al.*, 2014a). Os estrogênios adsorvidos no biofilme e nos sólidos em suspensão quantificados nos três sistemas MBBR estão apresentados na Tabela 5.6, cujos valores foram quantificados nos seguintes dias de operação após a adição dos estrogênios: 48 e 118 no TRH de 12 h e 160 e 230 no TRH de 8 h.

Tabela 5.6: Concentrações médias de E2 e EE2 adsorvidos no biofilme e nos sólidos em suspensão nos sistemas MBBR (n = 2).

Sistema	Local	E2 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		EE2 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
		TRH = 12 h	TRH = 8 h	TRH = 12 h	TRH = 8 h
MBBR-A	Biofilme	< 0,040	0,062 \pm 0,010	0,327 \pm 0,036	0,355 \pm 0,054
	SST	0,073 \pm 0,008	0,084 \pm 0,014	0,494 \pm 0,081	0,495 \pm 0,103
MBBR-H	Biofilme	0,124 \pm 0,028	0,139 \pm 0,011	0,422 \pm 0,035	0,412 \pm 0,016
	SST	0,180 \pm 0,018	0,181 \pm 0,025	0,640 \pm 0,060	0,607 \pm 0,037
MBBR-HA	Biofilme	0,098 \pm 0,012	0,102 \pm 0,013	0,455 \pm 0,059	0,441 \pm 0,059
	SST	0,192 \pm 0,013	0,187 \pm 0,028	0,575 \pm 0,079	0,577 \pm 0,025

Devido à maior hidrofobicidade do estrogênio 17 α -etinilestradiol, uma maior afinidade de adsorção em ambas as formas de biomassa foi observada em comparação com o 17 β -estradiol. REN *et al.* (2007) também quantificou concentrações de EE2

adsorvidas no lodo biológico superiores em relação aos outros estrogênios. Com relação à adsorção da estrona, porém, as concentrações em todas as amostras de biomassa, aderida e em suspensão, foram menores do que o limite de detecção da metodologia ($< 0,040 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

A adsorção de compostos orgânicos e inorgânicos é outra função dos EPS nos agregados microbianos (FLEMMING e WINGENDER, 2010). A adsorção dos estrogênios foi maior nos sólidos em suspensão em todos os casos do que nas amostras de biofilme. LUO *et al.* (2014a) obtiveram resultados similares na adsorção de vários micropoluentes na biomassa aderida e em suspensão. Os autores concluíram que este comportamento ocorreu possivelmente devido à maior capacidade de biodegradação dos estrogênios pelos agregados microbianos na forma de biofilme por causa da sua composição físico-química e pela diversidade de micro-organismos presentes. Entretanto, de acordo com os estudos de GUNNARSSON *et al.* (2009), a quantidade de EE2 adsorvida em biofilmes foi superior à observada em sistemas com biomassa em suspensão, por causa da maior hidrofobicidade e da composição da biomassa dos biofilmes. Desta forma, faz-se necessária uma investigação mais aprofundada para a compreensão completa do impacto da composição e da morfologia da biomassa na adsorção de estrogênios e de outros micropoluentes.

Na investigação de adsorção de estrogênios na biomassa de outro sistema MBBR (LUO *et al.*, 2014a), observou-se concentrações de E2 e EE2 adsorvidas na biomassa menores do que as observadas no presente estudo. Porém, o sistema operou com TRH de 24 h (o dobro do maior TRH utilizado nesta tese), concentração inicial de estrogênio de $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (inferior ao utilizado nesta tese) e efluente sintético similar ao alimentado ao MBBR-HA, o que resultou em aproximadamente $0,025 - 0,050 \mu\text{g E2}\cdot\text{g}^{-1}$ biomassa e $0,100 - 0,500 \mu\text{g EE2}\cdot\text{g}^{-1}$ biomassa. FENG *et al.* (2010) investigaram o efeito da concentração inicial dos estrogênios e verificaram que quantidades maiores de EE2 foram detectadas no lodo biológico ao ampliar a dosagem de estrogênio no experimento, o que explicaria os distintos resultados obtidos por LUO *et al.* (2014a) e a presente tese.

Na literatura encontra-se uma ampla faixa de concentrações de estrogênios adsorvidos em lodo biológico, normalmente em sistemas com sólidos em suspensão, com valores desde $<0,002$ a $0,049 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (TERNES *et al.*, 2002) até concentrações maiores, como na ordem de 10^1 a $10^3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FENG *et al.*, 2010; RACZ *et al.*, 2012). Em um reator com biomassa fixa operando com TRH de 32 h e concentrações iniciais

de E2 e EE2 de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, não foram detectadas concentrações dos estrogênios adsorvidas à biomassa (PIEPER e ROTARD, 2011). Porém, acredita-se que devido ao elevado TRH do sistema, a biodegradação dos compostos adsorvidos possa ter ocorrido.

As razões para esta variabilidade pode ser uma combinação de inúmeros fatores como, por exemplo, as características dos efluentes (esgoto *in natura* ou efluente sintético, carga orgânica, pH e temperatura), concentração dos estrogênios e condições operacionais (TRH, TRS). Além disso, estes parâmetros influenciam diretamente nas características morfológicas e composição da biomassa, o que também afeta as concentrações adsorvidas de estrogênios, com resultados tão distintos entre si (KOH *et al.*, 2008). Entretanto, não existe na literatura um estudo que comprove a relação direta entre a adsorção de micropoluentes com a concentração e composição de EPS (KNUNJAR e LOVE, 2011; XU *et al.*, 2013a), possivelmente, devido ao impacto de inúmeros fatores neste processo e a dificuldade analítica para identificar interações tão complexas entre EPS e estes compostos em baixas concentrações.

Vários micropoluentes orgânicos podem ser adsorvidos no lodo biológico devido à presença de sítios, como em regiões hidrofóbicas dos exopolímeros (FLEMMING e LEIS, 2002 *apud* SHENG *et al.*, 2010). De acordo com estes autores, o elevado número de grupos disponíveis de carboxila e hidroxila resulta em uma capacidade de adsorção alta dos EPS. No estudo realizado por JORAND *et al.* (1998) sobre as características dos exopolímeros, constatou-se que aproximadamente 7% do EPS possuía característica hidrofóbica e o restante hidrofílica, sendo compostas basicamente por proteínas e carboidratos, respectivamente. O percentual de E2 adsorvido na fração hidrofóbica da biomassa constatada no estudo de LEE *et al.* (2011) foi de 30%, entretanto, nenhuma adsorção foi detectada na fração hidrofílica.

Com relação ao efeito do pH na adsorção, FENG *et al.* (2010) observaram que as concentrações de adsorção de equilíbrio de EE2 não sofreram nenhuma alteração nos experimentos realizados com pH entre 2 e 6. Entretanto, uma redução na quantidade de estrogênio adsorvido de 2,14 para 1,43 mg.g^{-1} SST foi identificada com valores de pH superiores a 6,0.

No presente estudo, nenhuma variabilidade significativa foi observada na adsorção dos estrogênios devido à redução do TRH de 12 para 8 h, porém, apenas um número reduzido de amostras foi avaliado em cada condição operacional devido às limitações na obtenção das amostras. De acordo com a literatura, o equilíbrio de adsorção dos estrogênios ao lodo biológico é atingido entre 10 min e 1 h (REN *et al.*,

2007; YI e HARPER, 2007; FENG *et al.*, 2010), e por este motivo este parâmetro não resultou em alterações na quantidade adsorvida dos compostos com os dois TRH investigados.

Os tratamentos biológicos com biomassa aderida, assim como o MBBR, operam com TRS superior aos normalmente utilizados em biorreatores com biomassa em suspensão, o que, de acordo com a literatura, poderia potencializar a adsorção e as eficiências de remoções globais destes compostos (TRAN *et al.*, 2013; BANIHASHEMI e DROSTE, 2014; LUO *et al.*, 2014b; PETRIE *et al.*, 2014b). No caso dos sistemas MBBR pode-se considerar que o TRS é elevado, não sendo um parâmetro ajustável neste tipo de reator biológico.

Na avaliação do impacto da comunidade microbiana na adsorção dos estrogênios à biomassa aderida e em suspensão, quantificou-se uma menor capacidade de adsorção de ambos os estrogênios na biomassa do MBBR-A em comparação aos biorreatores MBBR-H e MBBR-HA. Em experimentos de adsorção do EE2 em biomassa inativa de monoculturas, KHUNJAR *et al.* (2008) verificou que apenas $4,9 \pm 1,6\%$ do EE2 foi adsorvido na biomassa produzida pela cultura pura de *Nitrosomonas europaea*, enquanto que em biomassas de culturas de bactérias heterotróficas os percentuais foram superiores ($64,3 \pm 3,9$ e $71,6 \pm 5,3\%$).

A biomassa presente no MBBR-A não pode ser considerada pura e, provavelmente, bactérias heterotróficas estavam presentes em menor proporção, sendo as principais responsáveis pela produção dos EPS e a consequente adsorção dos estrogênios. KHUNJAR e LOVE (2011) também concluíram que a produção de exopolímeros por bactérias heterotróficas em ETEs favorece a adsorção de micropoluentes orgânicos. As concentrações adsorvidas de E2 nas biomassas dos sistemas MBBR-H e MBBR-HA foram similares entre si. Por outro lado, uma adsorção levemente superior do EE2 foi observada no MBBR-H, quando em comparação ao MBBR-HA. Desta forma, conclui-se que as bactérias nitrificantes e sua biomassa exerceram uma baixa influência na adsorção dos estrogênios com a baixa carga de nitrogênio amoniacal aplicada ($0,04 - 0,15 \text{ kg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) nestes biorreatores.

Uma das vantagens do sistema MBBR frente aos sistemas convencionais de lodos ativados é a menor geração de lodo de excesso que, posteriormente, precisa ser tratado/descartado adequadamente. Desta forma, o possível impacto ambiental de contaminação do solo e corpos receptores (superficiais e subterrâneos) poderia ser minimizado pela redução da aplicação do lodo como fertilizante em plantações.

5.7 Balanço de massa dos estrogênios

Nas Figuras 5.21 e 5.22 estão apresentados os resultados do balanço de massa do 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol, respectivamente, onde se pode visualizar o destino de ambos os estrogênios nos experimentos realizados: biodegradação, adsorção ou descarte com o efluente final.

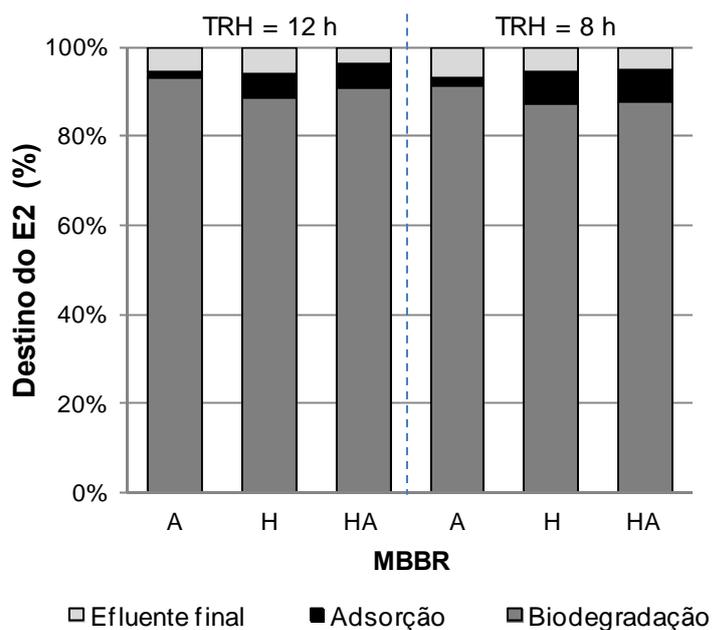


Figura 5.21: Influência da comunidade microbiana no destino do 17β -estradiol nos sistemas MBBR.

Conforme pode ser observado nas Figuras 5.21 e 5.22, a biodegradação foi o principal destino dos estrogênios nos sistemas MBBR nas condições operacionais investigadas. Os percentuais de biodegradação de E2 foram similares entre as distintas comunidades microbianas com valores entre 87,1 e 93,1%. Entretanto, o EE2 se mostrou mais resistente à biodegradação do que o E2, apesar da similaridade entre as suas estruturas moleculares. Isto ocorre devido ao fato que o grupamento *etnil*, localizado na posição 17 do estrogênio EE2, potencialmente bloqueia a formação de uma cetona e impede estericamente o acesso ao grupo hidroxila nesta mesma posição (WEBER *et al.*, 2005). A maior eficiência de biodegradação do EE2 foi alcançada por cometabolismo no MBBR-A (69,6 – 71,2%), seguida pelo MBBR-HA (50,9 – 57,4%) e pelo MBBR-H (41,6 – 49,9%). É importante de ressaltar que a biodegradação não é

sinônimo de mineralização destes compostos, e que a identificação/quantificação das rotas de biodegradação e os subprodutos formados não estava no escopo do presente trabalho.

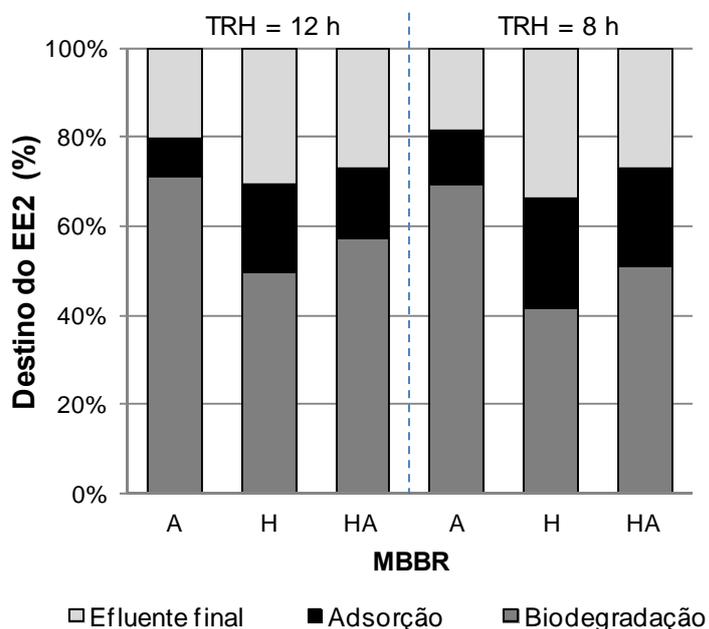


Figura 5.22: Influência da comunidade microbiana no destino do 17α -etinilestradiol nos sistemas MBBR.

As maiores eficiências de biodegradação de EE2 obtidas pelas bactérias nitrificantes do sistema MBBR-A está em consonância com o que foi exposto por KHUNJAR *et al.* (2011). Os autores observaram que a biodegradação deste estrogênio foi cinco vezes mais rápida por bactérias que oxidam a amônia (BOA) do que por bactérias heterotróficas, considerando apenas a biotransformação (sem mineralização). A remoção do EE2 vem sendo atrelada a presença de bactérias nitrificantes desde os estudos de VADER *et al.* (2000) e posteriormente por SHI *et al.* (2004), YI e HARPER (2007), SKOTNICKA PITAK *et al.* (2009), TRAN *et al.* (2013), entre outros.

A biotransformação do EE2 pelas bactérias nitrificantes ocorre por cometabolismo (REN *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014b), conforme descrito anteriormente no capítulo 3.7.1.3. O efeito positivo da presença de bactérias nitrificantes pode ser visualizado na comparação dos percentuais de biodegradação de EE2 obtidos entre os reatores biológicos com predominância de bactérias heterotróficas (MBBR-H) e o que possuía a presença dos dois grupos na comunidade microbiana (MBBR-HA). Nota-se que houve uma diferença de 7,5 e 9,3 pontos percentuais para

TRH de 12 e 8 h, respectivamente, na biodegradação do EE2 entre os dois sistemas MBBR que receberam a mesma carga orgânica carbonácea. No MBBR-H a nitrificação foi inibida com a adição do composto ATU, comprovada pela ausência de concentrações de nitrito e nitrato no efluente final, resultando em uma menor eficácia na remoção do 17 α -etinilestradiol.

Os sistemas MBBR-H e MBBR-HA apresentaram as maiores contribuições de adsorção do E2 com valores similares de 5,2 – 5,5% (TRH de 12 h) e de 7,1 – 7,4% (TRH de 8 h). Já na adsorção do EE2 no MBBR-H foi superior (19,5 – 24,9%), seguida pelo MBBR-HA (15,5 – 21,9%) e MBBR-A (8,4 – 11,9%). Os percentuais de adsorção de E2 obtidos nesta tese estão de acordo com alguns autores da literatura que indicam que a remoção de estrogênios por adsorção no tratamento de esgoto sanitário normalmente é inferior a 10% (ANDERSEN *et al.*, 2003; JOSS *et al.*, 2004; TERNES *et al.*, 2004; GABET-GIRAUD *et al.*, 2010). Contrariamente, outros estudos têm considerado a adsorção como uma forma significativa de remoção destes compostos (CLARA *et al.*, 2004; HOLBROOK *et al.*, 2004; CIRJA *et al.*, 2008; DE GUSSEME *et al.*, 2009), podendo chegar a 50% do estrogênio removido (SHI *et al.*, 2013). A variação dos resultados de adsorção entre as comunidades microbianas ocorreu possivelmente devido às melhores eficiências de biodegradação dos estrogênios nos reatores com bactérias nitrificantes, o que resultou na menor concentração adsorvida. Além disso, deve-se considerar o efeito da composição/morfologia da biomassa na adsorção destes compostos, conforme sugerido por LUO *et al.* (2014a).

Nos cálculos do balanço de massa, a adsorção dos estrogênios ao biofilme correspondeu a menos do que 0,001% em todos os casos em comparação aos outros destinos investigados. A contribuição da adsorção dos estrogênios no biofilme foi insignificante devido à baixa variação na massa de biofilme dos suportes (Δ_{BIO} de 0,55 a 1,20 g). Desta forma, pode-se considerar que os percentuais de adsorção representados nas Figuras 5.24 e 5.25 são representativos basicamente da adsorção nos sólidos em suspensão. O incremento na adsorção do EE2 após a redução do TRH de 12 para 8 h ocorreu devido a maior produção de sólidos em suspensão.

Nas Figuras 5.23 e 5.24 podem-se verificar as concentrações e eficiências globais de remoção de E2 e EE2 (biodegradação e adsorção), respectivamente, nos efluentes finais produzidos pelos três reatores biológicos. Nestes gráficos fica evidente a similaridade entre as concentrações obtidas com os distintos TRH investigados, tanto para o E2 quanto para o EE2, ao longo dos 120 dias de operação em cada condição

operacional. Durante os primeiros dias de operação após a adição dos estrogênios, as concentrações determinadas nos efluentes finais de E2 e EE2 foram levemente inferiores aos observados posteriormente. Isto ocorreu por causa da alta capacidade de adsorção da biomassa neste período, bem como pela intensa produção de EPS. Posteriormente, a remoção dos estrogênios se deu principalmente pela contribuição da biodegradação.

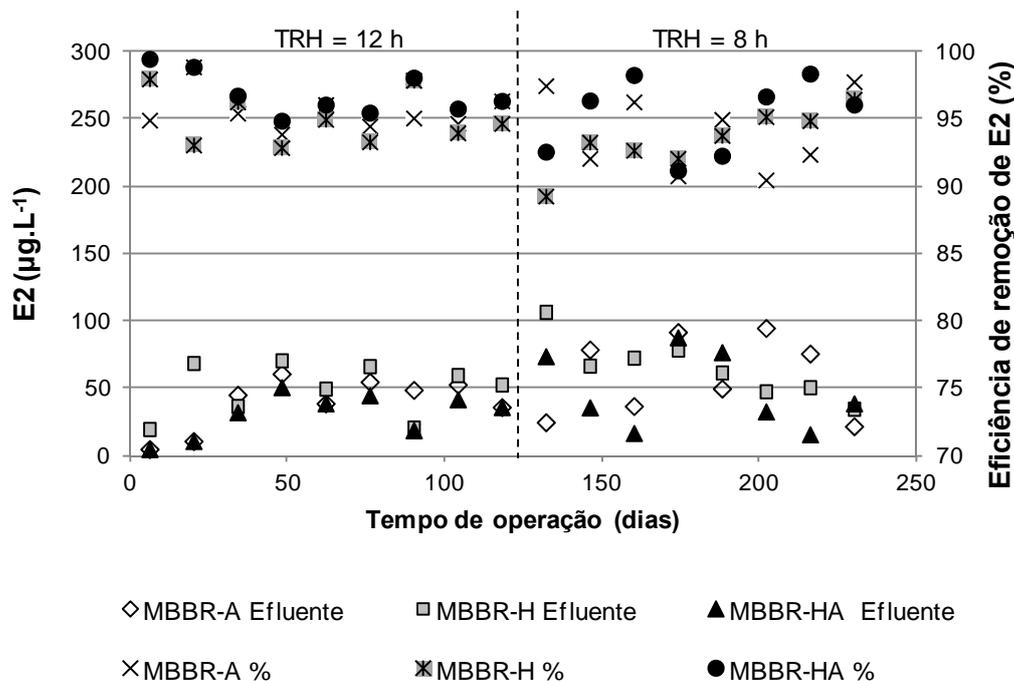


Figura 5.23: Concentrações médias nos efluentes e eficiências de remoção de E2 nos três sistemas MBBR.

As eficiências de remoção global dos estrogênios obtidas dos sistemas MBBR (Figuras 5.23 e 5.24), englobando tanto a biodegradação quanto a adsorção na biomassa, variaram de 93,3 a 96,1% para o E2 e de 69,4 a 81,5% para o EE2. Em comparação ao balanço de massa calculado para o MBBR investigado por LUO *et al.* (2014a), as eficiências de remoção globais obtidas pelos autores foram similares para o E2 ($96,2 \pm 2,2\%$) e levemente superiores para o EE2 ($85,2 \pm 4,5\%$). A influência do TRH na remoção de estrogênios pelo sistema MBBR pode ser considerada pouco significativa, desde que pequenas diferenças nos resultados foram observadas entre o presente estudo com TRH de 8 a 12 h e o estudo de LUO *et al.* (2014a) com TRH de 24 h.

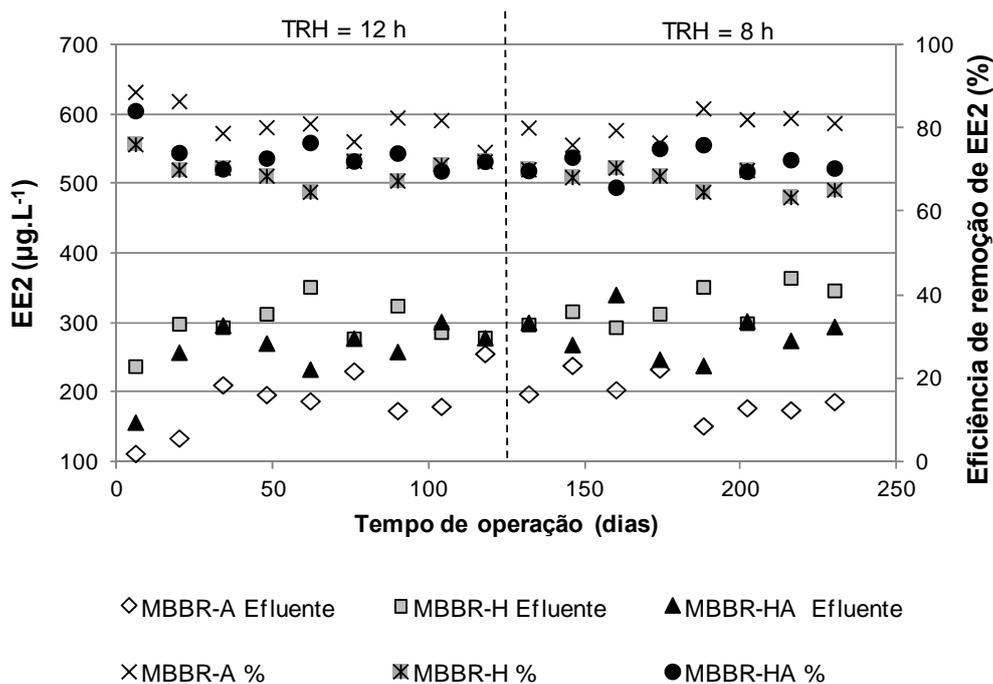


Figura 5.24: Concentrações médias nos efluentes e eficiências de remoção de EE2 nos três sistemas MBBR.

Outros autores que investigaram a remoção de estrogênios em reatores de leito fixo chegaram as mesmas conclusões, de que o TRH tem nenhum ou pouco impacto nas eficiências de remoção destes compostos (JOSS *et al.*, 2004; PIEPER e ROTARD, 2011). Na investigação de JOSS *et al.* (2004), um reator de leito fixo com TRH de apenas 35 min foi suficiente para a obtenção de eficiências de remoção de $90 \pm 3\%$, $\geq 95\%$ e $69 \pm 9\%$ para E1, E2 e EE2, respectivamente. Entretanto, nenhum outro estudo da literatura com biomassa fixa obteve eficiências tão altas com TRH tão baixos, sendo necessária a realização de novos experimentos para comprovar esta eficácia. De acordo com estes autores, as altas remoções atingidas ocorreram por causa das características do lodo biológico, resultante do TRS elevado e da biomassa na forma de biofilme.

Ao se comparar os resultados alcançados com os de sistemas convencionais de lodos ativados observa-se que as eficiências de remoções atingidas são similares (RACZ *et al.*, 2012; PETRIE *et al.*, 2014a). URASE e KIKUTA (2005) analisaram a degradação de E2 e EE2 ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) em sistemas de lodo ativado em batelada com efluente sintético e observaram que o E2 foi degradado rapidamente, diferentemente do EE2 que mesmo após 100 h não foi completamente removido. Os micro-organismos presentes no lodo degradaram os micropoluentes mais rapidamente em sistemas onde

existia uma menor quantidade de compostos mais facilmente biodegradáveis (menor relação A/M).

Apenas os estrogênios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol foram adicionados nos sistemas MBBR, entretanto, a estrona foi quantificada nos efluentes produzidos, conforme representado na Figura 5.25. A primeira etapa da principal rota de biodegradação aeróbia do E2 ocorre através da formação da estrona (E1), com a dehidrogenação do anel D em C-17 (TERNES *et al.*, 1999b; SHI *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2013). Em relação ao EE2, a primeira etapa da biodegradação pode ocorrer por cinco rotas distintas, das quais uma é pela formação da estrona com conversão do anel D em C-17 por bactérias heterotróficas (YU *et al.*, 2013). Como a conversão de E2 em E1 ocorre rapidamente, a estrona foi detectada nos efluentes dos sistemas MBBR já nas primeiras análises realizadas após 6 dias da adição dos estrogênios, com posterior incremento na sua concentração.

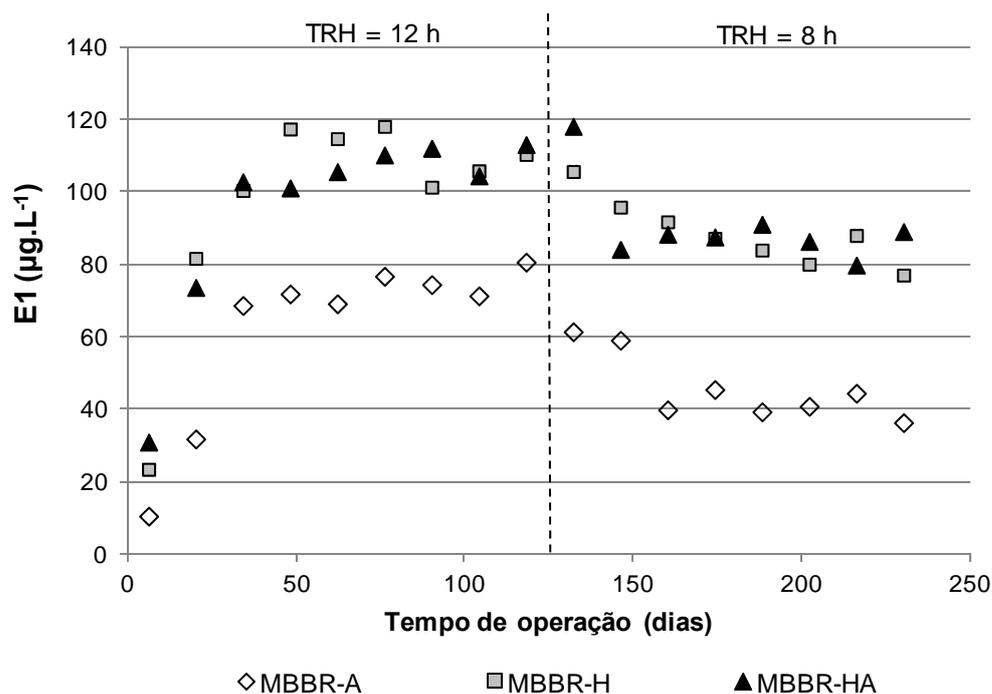


Figura 5.25: Concentrações médias de E1 nos efluentes dos três sistemas MBBR.

O surgimento da estrona ocorreu nos três sistemas MBBR, com valores superiores e similares entre si nos sistemas MBBR-H e MBBR-HA. No reator com biomassa predominantemente nitrificante, a formação de estrona também ocorreu apesar de na literatura as rotas de biodegradação de E2 e EE2 com formação de E1 terem sido

descritas apenas para bactérias heterotróficas (YU *et al.*, 2013). Não foi possível calcular o percentual de remoção da estrona por biodegradação, uma vez que não se tem a informação da quantidade de E1 formada pela biodegradação de E2 e EE2, já que existe mais de uma rota de biodegradação destes compostos, não podendo ser considerada uma conversão de 100% em estrona.

No presente estudo e na maioria das investigações publicadas, o TRH utilizado nos tratamentos biológicos com o propósito de remover estrogênios é sempre superior aos TRH convencionalmente utilizados em ETEs. Além disso, uma gama de outros micropoluentes é encontrada no esgoto sanitário e deveria ser concomitantemente removida nos sistemas de tratamento. Neste contexto, as eficiências de remoção observadas nesta tese com a utilização de efluentes sintéticos poderiam ser menores quando avaliadas com esgoto sanitário real e em plantas em larga escala, necessitando de um estudo mais aprofundado para verificação destes resultados. Uma das vantagens do sistema MBBR frente aos sistemas convencionais de lodos ativados é a possibilidade de utilização de sistemas mais compactos, com TRH em torno de 1 h para remoção de matéria orgânica facilmente biodegradável. Entretanto, para a remoção de compostos recalcitrantes, como o EE2, deve-se considerar a possibilidade de utilização de um tratamento terciário para complementação da remoção destes compostos caso sejam utilizados TRH inferiores aos estudos nesta tese.

É possível adicionar os suportes plásticos do MBBR em sistemas convencionais de lodos ativados, transformando-os em sistemas IFAS (sigla do termo em inglês *Integrated Fixed-Film Activated Sludge*) com pequenas alterações operacionais (adição de grades na saída do reator para contenção dos suportes e redimensionamento do sistema de aeração). Nestes casos, seria possível utilizar uma instalação existente para aumentar a carga orgânica aplicada, melhorar o desenvolvimento da nitrificação e, possivelmente, otimizar a remoção de micropoluentes, mesmo que de forma parcial.

Apesar das concentrações de estrogênios utilizadas nesta tese não serem representativas das observadas em amostras de esgoto *in natura*, os resultados obtidos fornecem informações úteis quanto às capacidades de biodegradação e adsorção de biofilmes majoritariamente compostos por bactérias nitrificantes ou heterotróficas, e a mistura de ambas. Além disso, este trabalho proporcionou informações importantes quanto à utilização do sistema MBBR para remoção de estrogênios.

6. CONCLUSÕES

Nesta tese investigou-se o desempenho de distintas comunidades microbianas na remoção de estrogênios em reatores de leito móvel com biofilme com efluente sintético. Durante o período de estabilização sem os estrogênios, os sistemas MBBR apresentaram operação estável. Entretanto, nos dias subsequentes à adição dos estrogênios, observaram-se alguns efeitos nos reatores biológicos:

- No MBBR-A a nitrificação (segunda etapa) foi parcialmente inibida com decréscimo da taxa de remoção de N-NH_4^+ e subsequente recuperação. Este efeito de inibição também pode ser evidenciado pela queda na produção do íon nitrato.
- Intenso crescimento na concentração de exopolímeros nos três sistemas MBBR evidenciado pelas concentrações de SST, SSV, biomassa seca aderida e polissacarídeos e proteínas totais. Apesar disso, a turbidez do efluente final foi inferior a 6,0 UNT devido à boa sedimentabilidade do lodo produzido após 10 min de decantação.
- Incremento nas concentrações de DQO solúvel nos efluentes produzidos pelos sistemas MBBR foi evidenciada, possivelmente pela solubilização dos EPS e geração dos produtos microbianos solúveis (PMS).
- Observou-se um aumento visual do número de bactérias filamentosas presentes no biofilme aderido aos suportes após a adição dos estrogênios. Acredita-se que a elevada produção de EPS pode ter resultado em problemas na difusão do oxigênio dissolvido até as regiões mais profundas do biofilme.

A adsorção dos estrogênios em todos os casos foi maior nos sólidos em suspensão do que nas amostras de biofilme, possivelmente devido à maior atividade microbiana na forma aderida da biomassa com a biodegradação dos compostos. Devido à maior hidrofobicidade do EE2, maiores concentrações foram quantificadas em ambas as formas de biomassa em comparação com o E2. O TRH não teve impacto significativo na quantidade adsorvida dos compostos na biomassa. Uma menor capacidade de adsorção de ambos os estrogênios na biomassa autotrófica foi quantificada em comparação aos biorreatores com biomassa heterotrófica. A adsorção dos estrogênios ao biofilme correspondeu a menos do que 0,001% em todos os casos em comparação aos outros destinos investigados.

A biodegradação foi a principal forma de remoção dos dois estrogênios nos sistemas MBBR. Os percentuais de biodegradação de E2 foram similares entre as distintas comunidades microbianas com valores de 87,1 a 93,1%. Entretanto, o EE2 se mostrou mais resistente à biodegradação, com a maior eficiência de biodegradação no MBBR-A (69,6 – 71,2%), seguida pelo MBBR-HA (50,9 – 57,4%) e pelo MBBR-H (41,6 – 49,9%).

As eficiências de remoção globais dos sistemas (biodegradação e adsorção na biomassa) obtidas nos biorreatores foram de 93,3 a 96,1% para o E2 e de 69,4 a 81,5% para o EE2. Estas eficiências de remoção globais foram tão altas quanto as observadas em sistemas convencionais de lodos ativados. O TRH na faixa investigada de 8 a 12 h teve pouca influência na remoção de estrogênios pelo sistema MBBR.

Uma das vantagens do sistema MBBR frente aos sistemas convencionais de lodos ativados é a possibilidade de utilização de sistemas mais compactos, com TRH em torno de 1 h para remoção de matéria orgânica facilmente biodegradável. Entretanto, para a remoção de compostos recalcitrantes, como o EE2, deve-se considerar a possibilidade de utilização de um tratamento terciário para complementação da remoção destes compostos caso sejam utilizados TRH inferiores aos estudos nesta tese. Outra vantagem é a menor produção de lodo de excesso, que resulta na redução de custos de tratamento e/ou disposição. Além disso, o sistema MBBR previne o arraste das bactérias nitrificantes para fora do biorreator, resultando no melhor desenvolvimento da nitrificação e podendo contribuir na remoção dos estrogênios.

Apesar das concentrações de estrogênios utilizadas nesta tese não serem representativas das observadas em amostras de esgoto *in natura*, os resultados obtidos fornecem informações úteis quanto às capacidades de biodegradação e adsorção de biofilmes majoritariamente compostos por bactérias nitrificantes ou heterotróficas, e a mistura de ambas. Além disso, este trabalho proporcionou informações importantes quanto à viabilidade de utilização do sistema MBBR para remoção de estrogênios.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Uma possibilidade que deve ser investigada é o acoplamento de sistemas biológicos compactos e com baixa produção de lodo, como o MBBR, com tratamentos terciários de baixo custo para remoção dos estrogênios sintéticos, que apresentam menor biodegradabilidade. Novas pesquisas com sistemas MBBR são necessárias com amostras reais de esgoto sanitário, com concentrações encontradas em amostras ambientais e em condições operacionais distintas, como TRH menores.

É importante avaliar os efeitos destes compostos nos micro-organismos dos sistemas biológicos, além de identificar por técnicas de biologia molecular o conjunto de micro-organismos que obtenha as melhores eficiências de remoção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMANN, D., SCHAAR, H., BARTEL, C., *et al.*, 2012, “Impact of ozonation on ecotoxicity and endocrine activity of tertiary treated wastewater effluent”, *Water Research*, v. 46, pp. 3693 – 3702.
- ANA (Agência Nacional de Águas), 2015, “Conjuntura dos Recursos Hídricos: Informe 2014”, disponível em: http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2015/Conjuntura_2014.pdf, acesso em: 01 de julho de 2015.
- ANDERSEN, H., SIEGRIST, H., SØRENSEN, B., *et al.*, 2003, “Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant”, *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 18, pp. 4021 – 4026.
- ANDERSEN, H.R., HANSEN, M., KJØLHOLT, J., *et al.*, 2005, “Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment”, *Chemosphere*, v. 61, pp. 139 – 146.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2003, “Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>, acesso em 12 de setembro de 2012.
- APHA, 1992, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.
- APHA, 2005, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.

- ATKINSON, S.K., MARLATT, V.L., KIMPE, L.E., *et al.*, 2012, “The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants”, *Science of the Total Environment*, v. 430, pp. 119 – 125.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., TYAGI, R.D., *et al.*, 2006, “Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge”, *Process Biochemistry*, v. 41, pp. 525 – 539.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., TYAGI, R.D., *et al.*, 2007, “Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater”, *Water Research*, v. 41, pp. 3281 – 3288.
- AVELLA, A.C., ESSENDOUBI, M., LOUVET, J.N., *et al.*, 2010, “Activated sludge behaviour in a batch reactor in the presence of antibiotics: study of extracellular polymeric substances”, *Water Science and Technology*, v. 61, pp. 3147 – 3155.
- AYGUN, A., NAS, B., BERKTAY, A., 2008, “Influence of high organic loading rates on COD removal and sludge production in moving bed biofilm reactor”, *Environmental Engineering Science*, v. 25, n. 9, pp. 1311-1316.
- BAGNALL, J. P., ITO, A., MCADAM, E. J., *et al.*, 2012, “Resource dependent biodegradation of estrogens and the role of ammonia oxidizing and heterotrophic bacteria”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 239 – 240, pp. 56 – 63.
- BANIHASHEMI, B., DROSTE, R.L., 2014, “Sorption-desorption and biosorption of bisphenol A, triclosan and 17 α -ethinylestradiol to sewage sludge”, *Science of Total Environment*, v. 487, pp. 813 – 821.
- BILA, D. MONTAVÃO, A.F., AZEVEDO, D.A., *et al.*, 2007, “Estrogenic activity removal of 17 β -estradiol by ozonation and identification of by-products”, *Chemosphere*, v. 69, pp. 736 – 746.
- BILA, D.M., DEZOTTI, M., 2007, “Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências”, *Química Nova*, v. 30, n. 3, pp. 651 – 666.

- BIRKETT, J.W., LESTER, J.N., 2003, “Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes”, 1^a edição, IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC: USA.
- BISTAN, M., TISLER, T., PINTAR, A., 2012, “Ru/TiO₂ catalyst for efficient removal of estrogens from aqueous samples by means of wet-air oxidation”, *Catalysis Communications*, v. 22, pp. 74 – 78.
- BOLONG, N., ISMAIL, A.F., SALIM, M.R., MATSUURA, T., 2009, “A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal”, *Desalination*, v. 239, pp. 229 – 246.
- BRADFORD, M. M., 1976, “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding”, *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248 – 254.
- BRANDA, S. S., VIK, A., FRIEDMAN, L., *et al.*, 2005, “Biofilms: the matrix revisited”, *Trends in Microbiology*, v. 13, pp. 20 – 26.
- CAJTHAML, T., KŘESIONVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., *et al.*, 2009, “Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol”, *Environmental Pollution*, v. 157, pp. 3325 – 3335.
- CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J.M., *et al.*, 2004, “Behavior of pharmaceuticals, cosmetic and hormones in a sewage treatment plant”, *Water Research*, v. 38, pp. 2918 – 2926.
- CHANG, H., CHOO, K., LEE, B., *et al.*, 2009a, “The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, pp. 1 – 12.
- CHANG, H., WAN, Y., HU, J.Y., 2009b, “Determination and source apportionment of five classes of steroid hormones in urban rivers”, *Environmental Science & Technology*, v. 43, pp. 7691 – 7698.

- CHAWLA, C., SARKAR, S., ALI, S., *et al.*, 2014, “Anaerobic digestibility of estrogens in wastewater sludge: effect of ultrasonic pretreatment”, *Journal of Environmental Management*, v. 145, pp. 307 – 313.
- CHEN, J.L., RAVINDRAN, S., SWIFT, S., *et al.*, 2012a, “Catalytic oxidative degradation of 17 α -ethinylestradiol by Fe^{III}-TAML/H₂O₂: Estrogenicities of the products of partial, and extensive oxidation”, *Water Research*, v. 46, pp. 6309 – 6318.
- CHEN, Q., SHI, J., WU, W., *et al.*, 2012b, “A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry”, *Microchemical Journal*, v. 104, pp. 49 – 55.
- CIRJA, M., IVASHECHKIN, P., SCHÄFFER, A., *et al.*, 2008, “Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR)”, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 7, n.1, pp. 61 – 78.
- CLARA, M., STRENN, B., GANS, O., *et al.*, 2005, “Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants”, *Water Research*, v. 39, pp. 4797 – 4807.
- CLARA, M., STRENN, B., SARACEVIC, E., *et al.*, 2004, “Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol to sewage sludge”, *Chemosphere*, v. 56, pp. 843 – 851.
- CLOUZOT, L., DOUMENQ, P., ROCHE, N., *et al.*, 2010, “Kinetic parameters for 17 α -ethinylestradiol removal by nitrifying activated sludge developed in a membrane bioreactor”, *Bioresource Technology*, v.101, pp. 6425 – 6431.
- CLOUZOT, L., MARROT, B., DOUMENQ, P., *et al.*, 2008, “17 α -ethinylestradiol: an endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes

applied to water purification. A review”, *Environmental Progress*, v. 27, n. 3, pp. 383 – 396.

COLBORN, T., VOM SAAL, F. S., SOTO, A. M., 1993, “Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans”, *Environmental Health Perspectives*, v. 101 (5), pp. 378 – 384.

CONROY, O., SÁEZ, A.E., QUANRUD, D., *et al.*, 2007, “Changes in estrogen/anti-estrogen activities in ponded secondary effluents”, *Science of the Total Environment*, v. 382, pp. 311 – 323.

D’ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A., *et al.*, 2003, “Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities”, *Science of the Total Environment*, v. 302, pp. 199 – 209.

DE GUSSEME, B., PYCKE, B., HENNEBEL, T., *et al.*, 2009, “Biological removal of 17 α -ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor”, *Water Research*, v. 43, pp. 2493 – 2503.

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E.J., BRIGHTY, G.C., *et al.*, 1998, “Identification of estrogenic chemicals in STP effluents. 1. Chemical fractionation and in vivo biological screening”, *Environmental Science and Technology*, v. 32, pp. 1549 – 1558.

DIAS, A.C.V., GOMES, F.W., MELO, C. F., *et al.*, 2010, “Degradação da atividade estrogênica em água de abastecimento da região metropolitana do Rio de Janeiro”, In: *Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Foz do Iguaçu, PR.

DÍAZ-CRUZ, M.S., GARCÍA-GALÁN, M.J., GUERRA, P., *et al.*, 2009, “Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge”, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 11, pp. 1263 – 1275.

- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. *et al.*, 1956, “Colorimetric method for determination of sugars and substances”, *Analytical Chemistry*, v. 28 (3), pp. 350-356.
- ECHA (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY), 2015, disponível em: <http://echa.europa.eu/addressing-chemicals-of-concern/substances-of-potential-concern/endocrine-disruptor-expert-group>, acesso em 12 de fevereiro de 2015.
- ESTRADA-ARRIAGA, E.B., MIJAYLOVA, P.N., 2011, “Influence of operational parameters (sludge retention time and hydraulic residence time) on the removal of estrogens by membrane bioreactor”, *Environmental Science and Pollution Research*, v. 18, pp. 1121 – 1128.
- EUROPEAN COMMISSION, 2015, disponível em: http://ec.europa.eu/environment/index_en.htm, acesso em 14 de fevereiro de 2015.
- FENG .Y., ZHANG, Z., GAO, P., *et al.*, 2010, “Adsorption behavior of EE₂ (17 α -ethinylestradiol) onto the inactivated sewage sludge: kinetics, thermodynamics and influence factors”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 175, pp. 970 – 976.
- FILALI-MEKNASSI, Y., TYAGI, R.D., SURAMPALLI, R.Y., *et al.*, 2004, “Endocrine-disrupting compounds in wastewater, sludge-treatment process and receiving waters: overview”, *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, v. 8, n. 1, pp. 39 – 56.
- FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., 2010, “The biofilm matrix”, *Nature Reviews Microbiology*, v. 8 (9), pp. 623 – 633.
- FORREZ, I., CARBALLA, M., BOON, N., *et al.*, 2009, “Biological removal of 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in an aerated nitrifying fixed bed reactor during ammonium starvation”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 84, pp. 119 – 125.

- FROEHNER, S., PICCIONI, W., MACHADO, K.S., *et al.*, 2011, “Removal capacity of caffeine, hormones, and bisphenol by aerobic and anaerobic sewage treatment”, *Water, Air & Soil Pollution*, v. 216, pp. 463 – 471.
- FRONTISTIS, Z., DASKALAKI, V.M., HAPESHI, E., *et al.*, 2012, “Photocatalytic (UV-A/TiO₂) degradation of 17 α -ethynylestradiol in environmental matrices: experimental studies and artificial neural network modeling”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 240, pp. 33 – 41.
- GABET-GIRAUD, V., MIÈGE, C., CHOUBERT, J.M., *et al.*, 2010, “Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants”, *Science of the Total Environment*, v. 408, pp. 4257 – 4269.
- GAULKE, L.S., STRAND, S.E., KALHORN, T.F., *et al.*, 2008, “17 α -ethynylestradiol transformation via abiotic nitration in the presence of ammonia oxidizing bacteria”, *Environmental Science & Technology*, v. 42, pp. 7622 – 7627.
- GERARDI, M.H., 2002, “Nitrification and denitrification in the activated sludge process”, *John Wiley & Sons Inc.*, New York, USA.
- GERRITY, D., GAMAGE, S., HOLADY, J.C., *et al.*, 2011, “Pilot-scale evaluation of ozone and biological activated carbon for trace organic contaminant mitigation and disinfection”, *Water Research*, v. 45, pp. 2155 – 2165.
- GHISELLI, G., JARDIM, W.F., 2007, “Interferentes endócrinos no ambiente”, *Química Nova*, v. 30, n. 3, pp. 695 – 706.
- GOMES, R.L., AVCIOGLU, E., SCRIMSHAW, M.D., *et al.*, 2004, “Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development”, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 10 – 11, pp. 737 – 744.

- GOMES, R.L., SCRIMSHAW, M.D., LESTER, J.N., 2003, "Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, pp. 697 – 707.
- GUITART, C., READMAN, J.W., 2010, "Critical evaluation of the determination of pharmaceuticals, personal care products, phenolic endocrine disrupters and faecal steroids by GC/MS and PTV-GC/MS in environmental waters", *Analytica Chimica Acta*, v. 658, pp. 32 – 40.
- GUNNARSSON, L., ADOLFSSON-ERICI, M., BJÖRLENIUS, B., *et al.*, 2009, "Comparison of six different sewage treatment processes – reduction of estrogenic substances and effects on gene expression in exposed male fish", *Science of the Total Environment*, v. 407, pp. 5235 – 5242.
- HAMID, H., ESKICIOGLU, C., 2012, "Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: a review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix", *Water Research*, v. 46, pp. 5813 – 5833.
- HAN, J., LIU, Y., SINGHAL, N., *et al.*, 2012, "Comparative photocatalytic degradation of estrone in water by ZnO and TiO₂ under artificial UVA and solar irradiation", *Chemical Engineering Journal*, v. 213, pp. 150 – 162.
- HASHIMOTO, T., MURAKAMI, T., 2009, "Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments", *Water Research*, v. 43, pp. 573 – 582.
- HE, Y., CHEN, W., ZHENG, X., *et al.*, 2013, "Fate and removal of typical pharmaceuticals and personal care products by three different treatment processes", *Science of the Total Environment*, v. 447, pp. 248 – 254.
- HOLBROOK, R.D., LOVE, N.G., NOVAK, J.T., 2004, "Sorption of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by colloidal organic carbon derived from biological wastewater treatment systems", *Environmental Science & Technology*, v. 38 (12), pp. 3322 – 3329.

- HOOPEL, A.G., TERRY, K.R., 1973, "Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*", *Journal of Bacteriology*, v. 115 (2), pp. 480 – 485.
- HUBER, M. M., GÖBEL, A., JOSS, A., *et al.*, 2005, "Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study", *Environmental Science & Technology*, v. 39, pp. 4290 – 4299.
- IASUR-KRUH, L., HADAR, Y., MINZ, D., 2011, "Isolation and bioaugmentation of an estradiol-degrading bacterium and its integration into a mature biofilm", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 11, pp. 3734 – 3740.
- JANECZKO, A., SKOCZOWSKI, A., 2005, "Mammalian sex hormones in plants", *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v. 43 (2), pp. 71 – 79.
- JOHNSON, A.C., AERNI, H.-R., GERRITSEN, A., *et al.*, 2005, "Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices", *Water Research*, v. 39, pp. 47 – 58.
- JOHNSON, A.C., BELFROID, A., DI CORCIA, A., 2000, "Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent", *Science of the Total Environment*, v. 256, pp. 163 – 173.
- JOHNSON, A.C., WILLIAMS, R.J., 2004, "A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works", *Environmental Science & Technology*, v. 38, pp. 3649 – 3658.
- JONES, O.H.A., GREEN, P.G., VOULVOULIS, N., *et al.*, 2007, "Questioning the excessive use of advanced treatment to remove organic micro-pollutants from waste water", *Environmental Science and Technology*, v. 41, pp. 5085 – 5089.

- JORAND, F., BOUE-BIGNE, F., BLOCK, J.C., *et al.*, 1998, “Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances”, *Water Science and Technology*, v. 37 (4 – 5), pp. 307 – 315.
- JORDÃO, E.P., PESSÔA, C.A., 2009, “Tratamento de Esgotos Domésticos”, 5ª edição, Synergia Editora, Rio de Janeiro, RJ.
- JOSS, A., ANDERSEN, H., TERNES, T., *et al.*, 2004, “Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization”, *Environmental Science and Technology*, v. 38, pp. 3047 – 3055.
- JOSS, A., KELLER, E., ALDER, A.C., *et al.*, 2005, “Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment”, *Water Research*, v. 39, pp. 3139 – 3152.
- JULIASTUTI, S.R., BAEYENS, J., CREEMERS, C., 2003, “Inhibition of nitrification by heavy metals and organic compounds: the ISO 9509 test”, *Environmental Engineering Science*, v. 20, pp. 79 – 90.
- KHAN, M.M.T., CHAPMAN, T., COCHRAN, K., *et al.*, 2013, “Attachment surface energy effects on nitrification and estrogen removal rates by biofilms for improved wastewater treatment”, *Water Research*, v. 47, pp. 2190 – 2198.
- KHUNJAR, W.O., LOVE, N.G., 2011, “Sorption of carbamazepine, 17 α -ethinylestradiol, iopromide and trimethoprim to biomass involves interactions with exocellular polymeric substances”, *Chemosphere*, v. 82, pp. 917 – 922.
- KHUNJAR, W.O., MACKINTOSH, S.A., SKOTNICKA-PITAK, J., *et al.*, 2011, “Elucidating the relative roles of ammonia oxidizing and heterotrophic bacteria during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol and trimethoprim”, *Environmental Science & Technology*, v. 45, pp. 3605 – 3612.

- KHUNJAR, W.O., SKOTNICKA-PITAK, J., LOVE, N.G., *et al.*, 2008, “Biotransformation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) during nitrification: the role of ammonia oxidizing bacteria versus heterotrophic bacteria”, In: World Environmental and Water Resources Congress 2008, Honolulu, Hawaii.
- KIMURA, K., TOSHIMA, S., AMY, G., *et al.*, 2004, “Rejection of neutral endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceutical active compounds (PhACs) by RO membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 245, pp. 71 – 78.
- KOH, Y.K.K., CHIU, T.Y., BOOBIS, A., *et al.*, 2008, “Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater”, *Environmental Technology*, v. 29, pp. 245 – 267.
- KOH, Y.K.K., CHIU, T.Y., BOOBIS, A.R., *et al.*, 2009, “Influence of operating parameters on the biodegradation of steroid estrogens and nonylphenolic compounds during biological wastewater treatment processes”, *Environmental Science and Technology*, v. 43 (17), pp. 6646 – 6654.
- KOUTANTOU, V., KOSTADIMA, M., CHATZISYMEON, E., *et al.*, 2013, “Solar photocatalytic decomposition of estrogens over immobilized zinc oxide”, *Catalysis Today*, v. 209, pp. 66 – 73.
- KUNACHEVA, C., STUCKEY, D.C., 2014, “Analytical methods for soluble microbial products (SMP) and extracellular polymers (ECP) in wastewater treatment systems: a review”, *Water Research*, v. 61, pp. 1 – 18.
- KUSTER, M., ALDA, M.J.L., HERNANDO, M.D., *et al.*, 2008, “Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain)”, *Journal of Hydrology*, v. 358, pp. 112 – 123.

- LARCHER, S., DELBÈS, G., ROBAIRE, B., *et al.*, 2012, “Degradation of 17 α -ethinylestradiol by ozonation – identification of the by-products and assessment of their estrogenicity and toxicity”, *Environment International*, v. 39, pp. 66 – 72.
- LARCHER, S., YARGEAU, V., 2013, “Biodegradation of 17 α -ethinylestradiol by heterotrophic bacteria”, *Environmental Pollution*, v. 173, pp. 17 – 22.
- LEE, J., CHO, J., KIM, S.H., *et al.*, 2011, “Influence of 17 β -estradiol binding by dissolved organic matter isolated from wastewater effluent on estrogenic activity”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, pp. 1280 – 1287.
- LI, F., YUASA, A., OBARA, A., *et al.*, 2005, “Aerobic batch degradation of 17- β estradiol (E2) by activated sludge: effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures”, *Water Research*, v. 39, pp. 2065 – 2075.
- LI, Y., ZHANG, A., 2014, “Removal of steroid estrogens from waste activated sludge using Fenton oxidation: influencing factors and degradation intermediates”, *Chemosphere*, v. 105, pp. 24 – 30.
- LIANG, Z., CHEN, Y., LI, W., *et al.*, 2011, “Autotrophic nitrogen removal in one lab-scale vertical submerged biofilm reactor”, *Physics and Chemistry of the Earth*, v. 36, pp. 470 – 474.
- LIU, J., WONG, M., 2013, “Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China”, *Environment International*, v. 59, pp. 208 – 224.
- LLORET, L., EIBES, G., FEIJOO, G., *et al.*, 2012, “Degradation of estrogens by laccase from *Myceliophthora thermophila* in fed-batch and enzymatic membrane reactors”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 213 – 214, pp. 175 – 183.
- LUNDSTRÖM, E., BJÖRLENIUS, B., BRINKMANN, M., *et al.*, 2010, “Comparison of six sewage effluents treated with different treatment technologies – Population

level responses in the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*”, *Aquatic Toxicology*, v. 96, pp. 298 – 307.

LUO, Y., GUO, W., NGO, H.H., *et al.*, 2014a, “Removal and fate of micropollutants in a sponge-based moving bed bioreactor”, *Bioresource Technology*, v. 159, pp. 311 – 319.

LUO, Y., GUO, W., NGO, H.H., *et al.*, 2014b, “A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment”, *Science of the Total Environment*, v. 473 – 474, pp. 619 – 641.

LUO, Y., JIANG, Q., NGO, H.H., *et al.*, 2015, “Evaluation of micropollutant removal and fouling reduction in a hybrid moving bed biofilm reactor – membrane bioreactor system”, *Bioresource Technology*, v. 191, pp. 355 – 359.

MACHERONE, A., 2012, “Derivatization procedure and negative chemical ionization GC/MS/MS conditions for the analysis of steroidal analogs”, Application Note of Agilent Technologies.

MAENG, S.K., CHOI, B.G., LEE, K.T., *et al.*, 2013, “Influences of solid retention time, nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors”, *Water Research*, v. 47, pp. 3151 – 3162.

MANICKUM, T., JOHN, W., 2014, “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 – 469, pp. 584 – 597.

MARGOT, J., KIENLE, C., MAGNET, A., *et al.*, 2013, “Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon?”, *Science of the Total Environment*, v. 461 – 462, pp. 480 – 498.

- MARTI, E.J., BATISTA, J.R., 2014, “Impact of secondary treatment types and sludge handling processes on estrogen concentration in wastewater sludge”, *Science of the Total Environment*, v. 470 – 471, pp. 1056 – 1067.
- MCADAM, E.J., BAGNALL, J.P., KOH, Y.K.K., *et al.*, 2010, “Removal of steroid estrogens in carbonaceous and nitrifying activated sludge processes”, *Chemosphere*, v. 81 (1), pp. 1 – 6.
- MORGAN-SAGASTUME, F., ALLEN, D.G., 2005, “Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45 °C”, *Water Research*, v. 39, pp. 1061 – 1074.
- NAKADA, N., TANISHIMA, T., SHINOHARA, H., *et al.*, 2006, “Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment”, *Water Research*, v. 40, pp. 3297 – 3303.
- NGHIEM, L.D., SCHÄFER, A.I., ELIMELECH, M., 2004, “Removal of natural hormones by nanofiltration membranes: measurement, modeling, and mechanisms”, *Environmental Science and Technology*, v. 38, n. 6, pp. 1888 – 1896.
- ØDEGAARD, H., 2006, “Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process”, *Water Science Technology*, v. 53, n. 9, pp. 17 – 33.
- PÁDUA, V.L., 2009, “Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano”, ABES, Rio de Janeiro, RJ.
- PASQUINI, L., MERLIN, C., HASSENBOEHLER, L., *et al.*, 2013, “Impact of certain household micropollutants on bacterial behavior. Toxicity tests/study of extracellular polymeric substances in sludge”, *Science of the Total Environment*, v. 463 – 464, pp. 355 – 365.

- PAUWELS, B., WILE, K., NOPPE, H., *et al.*, 2008, “17 α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol”, *Biodegradation*, v. 19, pp. 683 – 693.
- PESSOA, G.P., DE SOUZA, N.C., VIDAL, C.B., *et al.*, 2014, “Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants”, *Science of the Total Environment*, v. 490, pp. 288 – 295.
- PETRIE, B., MCADAM, E.J., HASSARD, F., *et al.*, 2014a, “Diagnostic investigation of steroid estrogen removal by activated sludge at varying solids retention time”, *Chemosphere*, v. 113, pp. 101 – 108.
- PETRIE, B., MCADAM, E.J., LESTER, J.N., *et al.*, 2014b, “Assessing potential modifications to the activated sludge process to improve simultaneous removal of a diverse range of micropollutants”, *Water Research*, v. 62, pp. 180 – 192.
- PIEPER, C., ROTARD, W., 2011, “Investigation on the removal of natural and synthetic estrogens using biofilms in continuous flow biofilm reactors and batch experiments analysed by gas chromatography/mass spectrometry”, *Water Research*, v. 45, pp. 1105 – 1114.
- PLÓSZ, B.G., LEKNES, H., LILTVED, H., *et al.*, 2010, “Diurnal variations in the occurrence and the fate of hormones and antibiotics in activated sludge wastewater treatment in Oslo, Norway”, *Science of the Total Environment*, v. 408, pp. 1915 – 1924.
- RACZ, L., GOEL, R.K., 2010, “Fate and removal of estrogens in municipal wastewater”, *Journal of Environmental Monitoring*, v. 12, pp. 58 – 70.
- RACZ, L., MULLER, J.G., GOEL, R.K., 2012, “Fate of selected estrogens in two laboratory scale sequencing batch reactors fed with different organic carbon sources under varying solids retention times”, *Bioresource Technology*, v. 110, pp. 35 – 42.

- RAS, M., LEFEBVRE, D., DERLON, N., *et al.*, 2011, “Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions”, *Water Research*, v. 45, pp. 1529 – 1538.
- REN, Y., NAKANO, K., NOMURA, M., *et al.*, 2007, “Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge”, *Water Research*, v. 41, pp. 3089 – 3096.
- ROUTLEDGE, E.J., SHEAHAN, D., DESBROW, C., *et al.*, 1998, “Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 2. In vivo responses in trout and roach”, *Environmental Science and Technology*, v. 32, pp. 1559 – 1565.
- RUSTEN, B., EIKEBROKK, B., ULGENES, Y. *et al.*, 2006, “Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors”, *Aquacultural Engineering*, v. 34, n. 3, pp. 322-331.
- SANT’ANNA JUNIOR, G. L., 2010, “Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações”, Editora Interciência, Rio de Janeiro, RJ.
- SARAVANABHAVAN, G., HELLEUR, R., HELLOU, J., 2009, “GC-MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall”, *Chemosphere*, v. 76, pp. 1156 – 1162.
- SBIB (SOCIEDADE BENEFICIENTE ISRAELITA BRASILEIRA ALBERT EINSTEIN), 2015, disponível em: <http://www.einstein.br/einstein-saude/tecnologia-e-inovacao/Paginas/terapia-hormonal-contra-o-cancer.aspx>, acesso em: 15 de março de 2015.
- SCHAAR, H., CLARA, M., GANS, O., *et al.*, 2010, “Micropollutant removal during biological wastewater treatment and a subsequent ozonation step”, *Environmental Pollution*, v. 158, pp.1399 – 1404.

- SERVOS, M. R., BENNIE, D. T., BURNISON, B. K., *et al.*, 2005, “Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants”, *Science of the Total Environment*, v. 336, pp. 155 – 170.
- SHAREEF, A., ANGOVE, M.J., WELLS, J.D., 2006, “Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 1108, pp. 121 – 128.
- SHENG, G.-P., YU, H.-Q., LI, X.-Y., 2010, “Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review”, *Biotechnology Advances*, v. 28, pp. 882 – 894.
- SHI, J., CHEN, Q., LIU, X., *et al.*, 2013, “Sludge/water partition and biochemical transformation of estrone and 17 β -estradiol in a pilot-scale step-feed anoxic/oxic wastewater treatment system”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 74, pp. 107 – 114.
- SHI, J., FUJISAWA, S., NAKAI, S., *et al.*, 2004, “Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*”, *Water Research*, v. 38, pp. 2323 – 2330.
- SHI, J.H., SUZUKI, Y., LEE, B.-D., *et al.*, 2002, “Isolation and characterization of the ethynylestradiol-biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1”, *Water Science and Technology*, v. 45 (12), pp. 175 – 179.
- SILVA, C.P., OTERO, M., ESTEVES, V., 2012, “Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review”, *Environmental Pollution*, v. 165, pp. 38 – 58.

- SIM, W., LEE, J., SHIN, S., *et al.*, 2011, “Assessment of fates of estrogens in wastewater and sludge from various types of wastewater treatment plants”, *Chemosphere*, v. 82, pp. 1448 – 1453.
- SIPMA, J., OSUNA, B., COLLADO, N., *et al.*, 2010, “Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems”, *Desalination*, v. 250, pp. 653 – 659.
- SKOTNICKA-PITAK, J., KHUNJAR, W.O., LOVE, N.G., *et al.*, 2009, “Characterization of metabolites formed during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol by *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous flow bioreactors”, *Environmental Science & Technology*, v. 43, pp. 3549 – 3555.
- SNSA (Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental), Ministério das Cidades, Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, 2014, “Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2012”, disponível em: <http://www.snis.gov.br/PaginaCarrega.php?EWRErterterTERTer=103>, acessado em: 20 de janeiro de 2015.
- SNYDER, S.A., ADHAM, S., REDDING, A.M., *et al.*, 2007, “Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals”, *Desalination*, v. 202, pp. 156 – 181.
- SPONZA, D.T., 2003, “Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, pp. 375 – 385.
- STASINAKIS, A.S., 2012, “Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion”, *Bioresource Technology*, v. 121, pp. 432 – 440.
- STUMPE, B., MARSCHNER, B., 2009, “Factors controlling the biodegradation of 17 β -estradiol, estrone and 17 α -ethinylestradiol in different natural soils”, *Chemosphere*, v. 74, pp. 556 – 562.

- SUAREZ, S., LEMA, J.M., OMIL, F., 2010, “Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions”, *Water Research*, v. 44, pp. 3214 – 3224.
- SUZUKI, K., HIRAIWA, H., MURATA, H., *et al.*, 2003, “Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi”, *Water Research*, v. 37, pp. 1972 – 1975.
- TCHOBANOGLOUS, G., BURTON, F.L., 1991, “Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse”, Metcalf & Eddy Inc., 3rd edition, New York, USA.
- TERNES, T.A., 2001, “Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples”, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 20, n. 8, pp. 419 – 434.
- TERNES, T.A., ANDERSEN, H., GILBERG, D., *et al.*, 2002, “Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS”, *Analytical Chemistry*, v. 74, n^o 14, pp. 3498 – 3504.
- TERNES, T.A., HERRMANN, N., BONERZ, M., *et al.*, 2004, “A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge”, *Water Research*, v. 38 (19), pp. 4075 – 4084.
- TERNES, T.A., KRECKEL, P., MUELLER, J., 1999b, “Behaviour and occurrence of estrogens in municipal treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge”, *The Science of the Total Environment*, v. 225, pp. 91 – 99.
- TERNES, T.A., STUMPF, M., MUELLER, J., *et al.*, 1999a, “Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil”, *The Science of the Total Environment*, v. 225, pp. 81 – 90.
- TRAN, N.H., URASE, T., NGO, H.H., *et al.*, 2013, “Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the

biodegradation of emerging trace organic contaminants”, *Bioresource Technology*, v. 146, pp. 721 – 731.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME), WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2013, “State of the science of endocrine disrupting chemicals – 2012”, disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78102/1/WHO_HSE_PHE_IHE_2013.1_eng.pdf?ua=1, acesso em 10 de novembro de 2014.

URASE, T., KIKUTA, T., 2005, “Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process”, *Water Research*, v. 39, pp. 1289 – 1300.

U.S.EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2011, “Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)”, disponível em: <http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm>, acesso em 21 de novembro de 2014.

U.S.EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2013, “Estimation Program Interface (EPI) Suite”, disponível em: <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.htm>, acesso em 30 de abril de 2013.

U.S.EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2015, “Drinking Water Contaminant Candidate List 4”, disponível em: <http://www2.epa.gov/ccl/draft-contaminant-candidate-list-4-ccl-4> , acesso em 10 junho de 2015.

VADER, J.S., VAN GINKEL, C.G., SPERLING, F.M.G.M, *et al.*, 2000, “Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge”, *Chemosphere*, v. 41, pp. 1239 – 1243.

VEOLIA, 2012, disponível em: http://veoliawatertechnologies.com/mbbr/en/technical_details.htm, acesso em 23 de janeiro de 2012.

- VISHNIAC, W., SANTER, M., 1957, “The thiobacilli”, *Bacteriological Reviews*, v. 21, pp. 195-213.
- WEBER, S., LEUSCHNER, P., KAMPFER, P., *et al.*, 2005, “Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, pp. 106 – 112.
- WESTERHOFF, P., YOON, Y., SNYDER, S., *et al.*, 2005, “Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes”, *Environmental Science & Technology*, v. 39, pp. 6649 – 6663.
- WHO (World Health Organization), 2012, “State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals”, disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78102/1/WHO_HSE_PHE_IHE_2013.1_eng.pdf?ua=1, acesso em 22 de fevereiro de 2012.
- XIE, W., NI, B., SEVIOUR, T., *et al.*, 2012, “Characterization of autotrophic and heterotrophic soluble microbial product (SMP) fractions from activated sludge”, *Water Research*, v. 46, pp. 6210 – 6217.
- XU, J., SHENG, G., MA, Y., *et al.*, 2013a, “Roles of extracellular polymeric substances (EPS) in the migration and removal of sulfamethazine in activated sludge system”, *Water Research*, v. 47, pp. 5298 – 5306.
- XU, N., ZHANG, Y., TAO, H., *et al.*, 2013b, “Bio-electron-Fenton system for enhanced estrogens degradation”, *Bioresource Technology*, v. 138, pp. 136 – 140.
- YANG, S., LI, X., 2009, “Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on the characteristics of activated sludge under non-steady-state conditions”, *Process Biochemistry*, v. 44, pp. 91 – 96.

- YI, T., HARPER JR., W.F., 2007, "The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol", *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 12, pp. 4311 – 4316.
- YI, T., MACKINTOSH, S., AGA, D.S., *et al.*, 2011, "Exploring 17 α -ethinylestradiol removal, mineralization, and bioincorporation in engineered bioreactors", *Water Research*, v. 45, pp. 1369 – 1377.
- YOON, Y., WESTERHOFF, P. SNYDER, S.A., *et al.*, 2006, "Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products", *Journal of Membrane Science*, v. 270, pp. 88 – 100.
- YOON, Y., WESTERHOFF, P., YOON, J., *et al.*, 2004, "Removal of 17 β -estradiol and fluoranthene by nanofiltration and ultrafiltration", *Journal of Environmental Engineering*, v. 130, n. 12, pp. 1460 – 1467.
- YU, C., DEEB, R.A., CHU, K., 2013, "Microbial degradation of steroidal estrogens", *Chemosphere*, v. 91, pp. 1225 – 1235.
- ZENG, Q., LI, Y., GU, G., 2009, "Nitrate-dependent degradation of 17 α -ethinylestradiol by acclimated activated sludge under anaerobic conditions", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 84, pp. 1841 – 1847.
- ZHENG, W., ZOU, Y., LI, X., *et al.*, 2013, "Fate of estrogen conjugate 17 α -estradiol-3-sulfate in dairy wastewater: comparison of aerobic and anaerobic degradation and metabolite formation", *Journal of Hazardous Materials*, v. 258 – 259, pp. 109 – 115.
- ZUO, Y., ZHANG, K., 2005, "Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide as derivatization reagent for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, v.1095, pp. 201 – 202.

Anexo A
Curvas de calibração

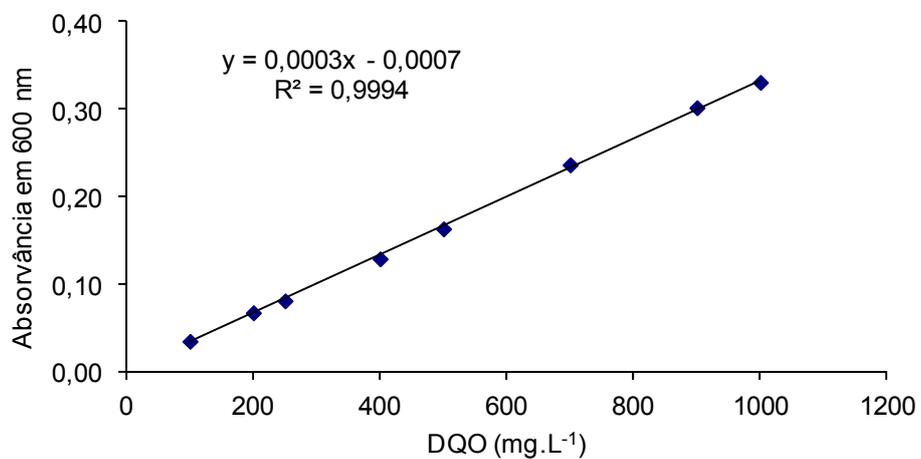


Figura A.1: Curva de calibração para análise de DQO com baixa concentração.

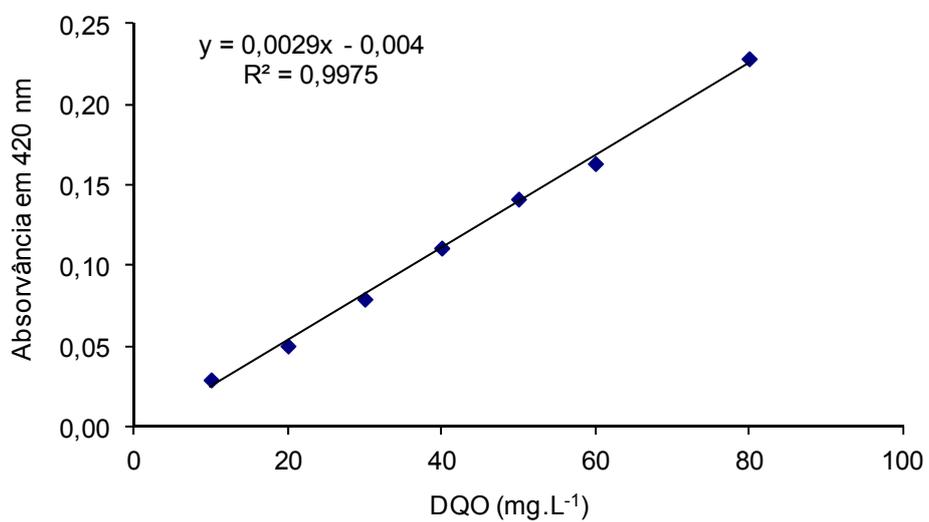


Figura A.2: Curva de calibração para análise de DQO com alta concentração.

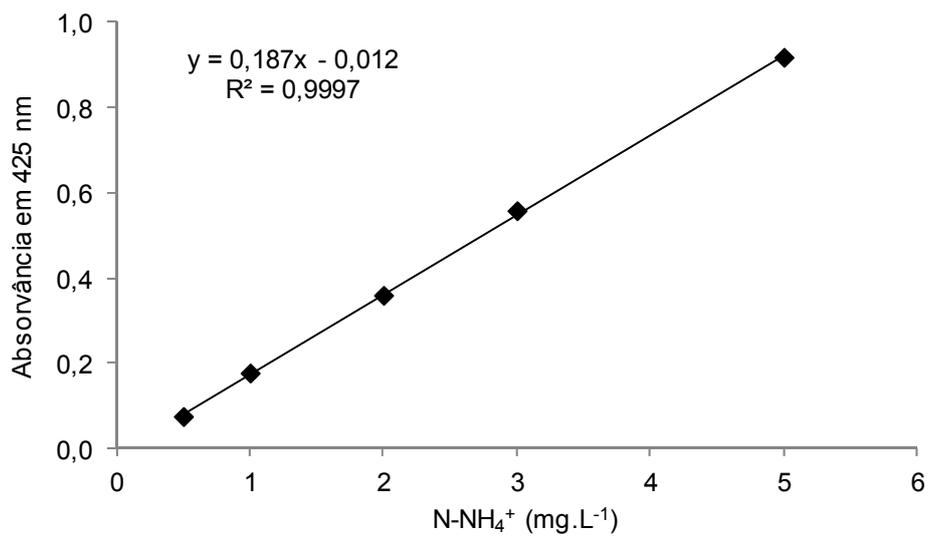


Figura A.3: Curva de calibração para análise de nitrogênio amoniacal.

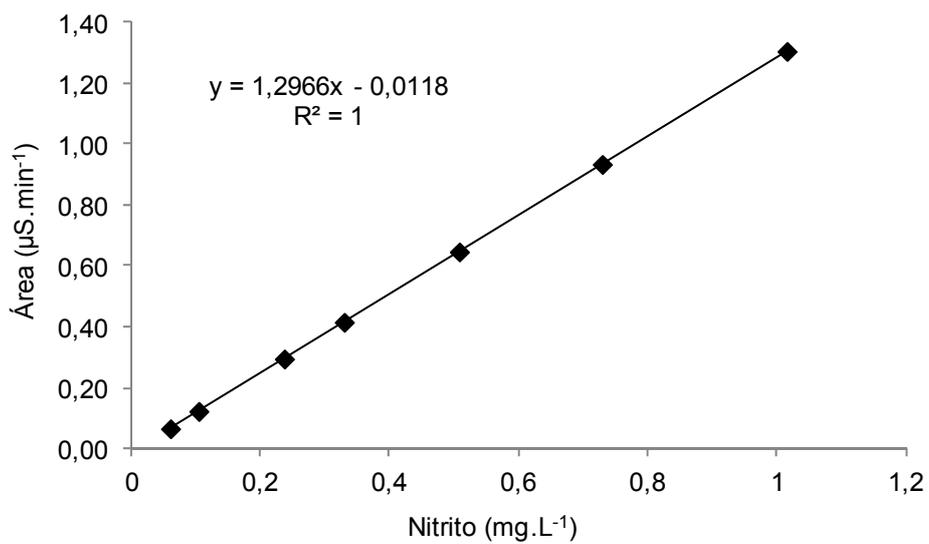


Figura A.4: Curva de calibração para análise de nitrito.

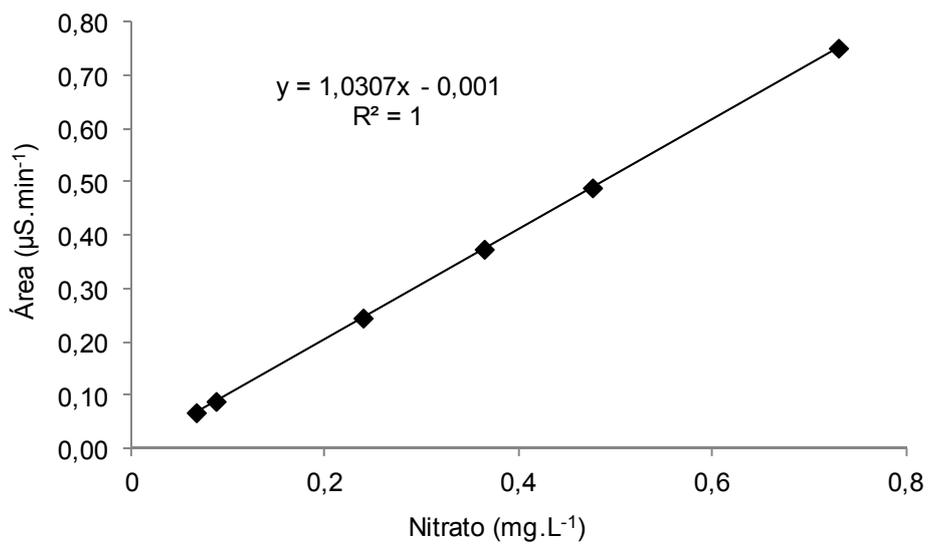


Figura A.5: Curva de calibração para análise de nitrato.

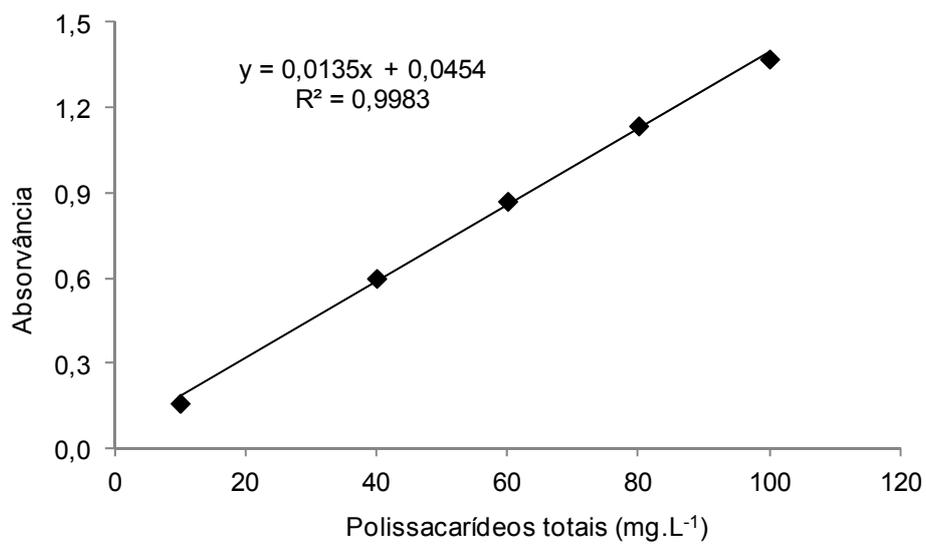


Figura A.6: Curva de calibração para análise de polissacarídeos totais.

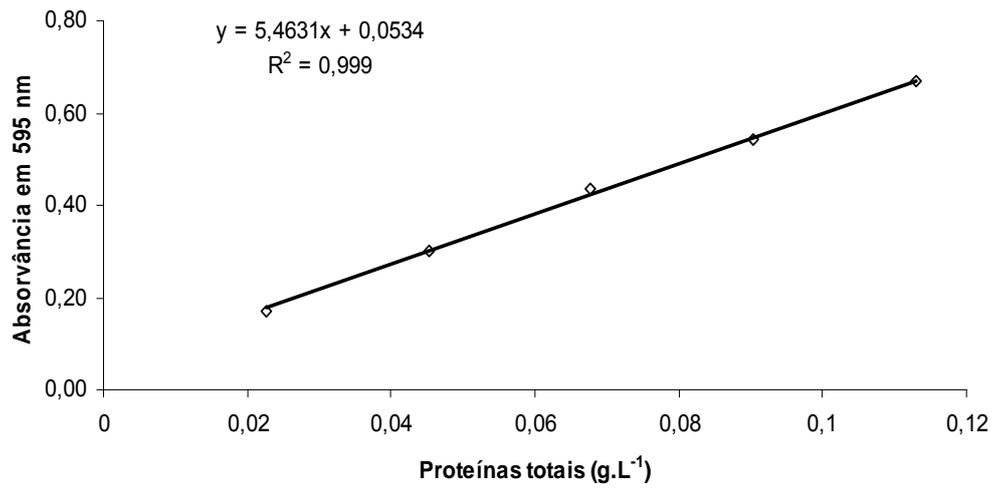


Figura A.7: Curva de calibração para análise de proteínas totais.

Anexo B

Resultados dos testes de hidrodinâmica

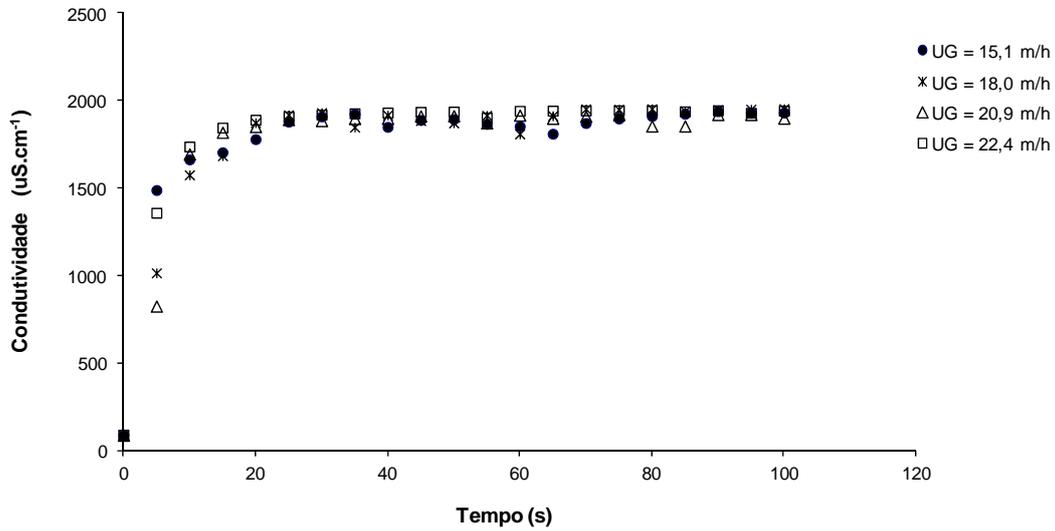


Figura B.1: Variação da condutividade no MBBR-A com o tempo para os testes hidrodinâmicos com U_G de $15,1 \text{ m.h}^{-1}$, $18,0 \text{ m.h}^{-1}$, $20,9 \text{ m.h}^{-1}$ e $22,4 \text{ m.h}^{-1}$.

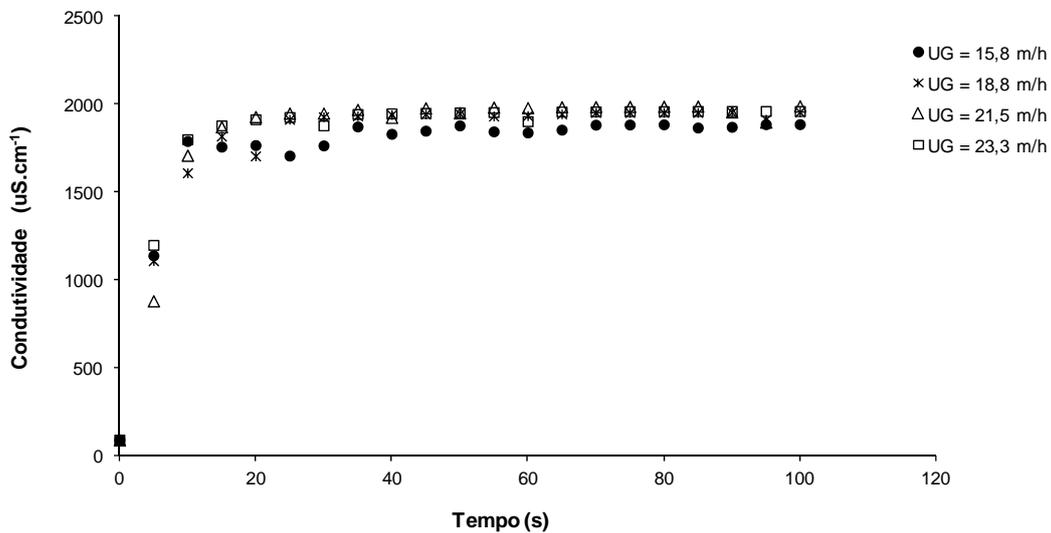


Figura B.2: Variação da condutividade no MBBR-H com o tempo para os testes hidrodinâmicos com U_G de $15,8 \text{ m.h}^{-1}$, $18,8 \text{ m.h}^{-1}$, $21,5 \text{ m.h}^{-1}$ e $23,3 \text{ m.h}^{-1}$.

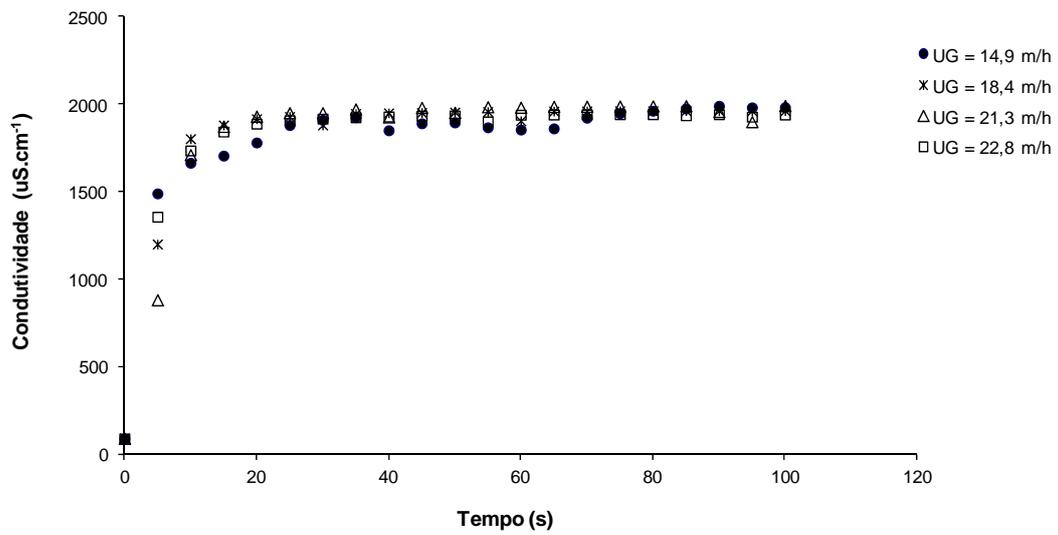


Figura B.3: Variação da condutividade no MBBR-HA com o tempo para os testes hidrodinâmicos com U_G de $14,9 \text{ m.h}^{-1}$, $18,4 \text{ m.h}^{-1}$, $21,3 \text{ m.h}^{-1}$ e $22,8 \text{ m.h}^{-1}$.

Anexo C

Resultados durante o período de estabilização

Tabela C.1: Resultados de DQO solúvel dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
5	22	40	84	18	22
7	29	37	87	17	26
10	26	36	89	14	19
12	15	33	91	24	26
14	25	21	94	18	28
17	19	25	96	14	23
19	25	21	98	19	29
21	18	22	101	17	32
24	22	25	103	21	30
26	21	21	105	22	26
28	17	23	108	27	22
31	27	24	110	22	26
33	25	25	112	25	28
35	20	21	115	19	22
38	19	28	117	22	21
40	17	22	119	27	27
42	21	28	122	21	20
45	22	24	124	16	18
47	12	25	126	14	22
49	27	20	129	18	27
52	21	21	131	19	30
54	24	22	133	25	21
56	19	21	136	23	22
59	22	25	138	18	30
61	28	21	140	22	27
63	16	18	143	19	22
66	18	26	145	26	21
68	12	20	147	16	18
70	27	28	150	27	30
73	23	20	152	22	28
75	13	24	154	21	31
77	14	18	157	19	30
80	19	20	159	26	21
82	26	21	161	18	22

Tabela C.1: Resultados de DQO solúvel dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização (continuação).

Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
164	14	18	203	19	19
166	12	31	206	15	26
168	22	27	208	26	30
171	21	22	210	22	27
173	23	26	213	23	31
175	17	21	215	18	34
178	18	31	217	17	22
180	28	28	220	21	21
182	26	22	222	13	22
185	28	18	224	25	26
187	25	26	227	27	19
189	19	24	229	22	28
192	25	25	231	18	22
194	13	27	234	21	25
196	19	22	236	19	27
199	28	21	238	26	21
201	26	18			

Tabela C.2: Resultados de nitrogênio amoniacal dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
5	32	16,8	84	15	9,4
7	26	14,3	87	14	10,5
10	18	10,9	89	11	7,6
12	19	12,2	91	15	5,2
14	12	11,0	94	19	5,8
17	14	10,9	96	15	7,2
19	24	8,5	98	14	5,0
21	30	9,1	101	12	5,8
24	24	7,6	103	15	9,4
26	18	8,3	105	11	5,2
28	13	5,2	108	16	8,6
31	18	6,8	110	16	10,1
33	12	6,3	112	15	8,3
35	14	8,2	115	17	7,3
38	17	9,3	117	18	5,3
40	19	6,6	119	11	7,4
42	21	7,2	122	15	9,2
45	22	5,4	124	17	10,1
47	17	10,5	126	13	5,4
49	25	8,1	129	15	7,2
52	18	7,2	131	13	6,5
54	14	8,4	133	12	8,7
56	17	9,7	136	16	7,3
59	22	7,4	138	15	8,1
61	21	5,2	140	20	9,8
63	17	5,0	143	14	5,3
66	16	8,2	145	17	6,1
68	21	7,6	147	18	8,6
70	21	7,3	150	12	5,5
73	15	6,7	152	16	7,0
75	16	6,6	154	11	8,9
77	19	5,4	157	14	7,2
80	14	5,7	159	13	8,8
82	21	7,2	161	11	10,2

Tabela C.2: Resultados de nitrogênio amoniacal dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização (continuação).

Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
164	13	5,6	203	14	5,6
166	15	7,7	206	15	6,9
168	12	8,1	208	18	9,1
171	13	5,0	210	15	8,5
173	12	6,5	213	14	7,3
175	17	9,2	215	18	9,6
178	15	6,3	217	16	9,5
180	16	8,5	220	14	8,3
182	19	5,5	222	13	8,8
185	14	7,2	224	17	9,1
187	18	9,4	227	12	5,5
189	17	8,3	229	18	6,2
192	21	8,9	231	15	8,0
194	18	8,4	234	14	10,2
196	14	7,9	236	17	5,9
199	13	8,0	238	16	5,2
201	17	7,7	240	14	6,0

Tabela C.3: Resultados de nitrato dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
3	26,40	3,62	82	166	10,40
5	60,59	5,39	84	155	13,24
7	70,00	5,87	87	145	9,59
10	109	6,13	89	152	8,20
12	148	8,50	91	147	8,24
14	188	8,88	94	163	10,77
17	128	12,83	96	147	13,66
19	127	8,82	98	154	7,18
21	140	10,11	101	150	5,75
24	148	11,63	103	161	11,68
26	114	12,98	105	144	9,27
28	102	9,68	108	159	10,57
31	155	11,55	110	162	13,30
33	126	8,32	112	151	12,82
35	116	11,34	115	159	11,00
38	134	8,50	117	143	9,73
40	132	9,36	119	139	7,70
42	144	7,60	122	159	9,92
45	138	7,81	124	152	13,69
47	145	12,60	126	160	10,60
49	147	12,88	129	150	13,00
52	164	7,76	131	144	9,10
54	145	10,31	133	161	7,98
56	144	14,98	136	133	13,11
59	146	11,02	138	136	7,90
61	160	10,17	140	150	7,32
63	145	10,27	143	139	12,00
66	139	7,31	145	138	8,28
68	142	9,07	147	148	11,29
70	145	12,44	150	146	10,81
73	139	8,49	152	141	9,00
75	142	9,80	154	155	7,92
77	158	9,39	157	163	14,53
80	155	7,59	159	145	8,24

Tabela C.3: Resultados de nitrato dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização (continuação).

Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
161	138	8,54	201	150	13,03
164	158	7,06	203	136	11,15
166	138	11,65	206	145	10,80
168	145	16,87	208	137	9,51
171	145	9,52	210	135	7,52
173	143	7,86	213	150	13,94
175	137	11,81	215	145	7,66
178	153	14,23	217	153	10,90
180	147	18,18	220	154	11,23
182	135	11,33	222	140	8,30
185	138	8,96	224	155	8,00
187	132	11,63	227	147	8,78
189	140	8,40	229	138	8,00
192	158	14,41	231	153	13,27
194	140	10,85	234	142	11,30
196	138	8,02	236	148	8,80
199	148	7,24			

Tabela C.4: Resultados de nitrito dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
3	40,39	<0,06	82	<0,06	<0,06
5	63,02	<0,06	84	<0,06	<0,06
7	75,24	<0,06	87	<0,06	<0,06
10	1,20	<0,06	89	<0,06	<0,06
12	<0,06	<0,06	91	<0,06	<0,06
14	<0,06	<0,06	94	<0,06	<0,06
17	<0,06	<0,06	96	<0,06	<0,06
19	<0,06	<0,06	98	<0,06	<0,06
21	<0,06	<0,06	101	<0,06	<0,06
24	<0,06	<0,06	103	<0,06	<0,06
26	<0,06	<0,06	105	<0,06	<0,06
28	<0,06	<0,06	108	<0,06	<0,06
31	<0,06	<0,06	110	<0,06	<0,06
33	<0,06	<0,06	112	<0,06	<0,06
35	<0,06	<0,06	115	<0,06	<0,06
38	<0,06	<0,06	117	<0,06	<0,06
40	<0,06	<0,06	119	<0,06	<0,06
42	<0,06	<0,06	122	<0,06	<0,06
45	<0,06	<0,06	124	<0,06	<0,06
47	<0,06	<0,06	126	<0,06	<0,06
49	<0,06	<0,06	129	<0,06	<0,06
52	<0,06	<0,06	131	<0,06	<0,06
54	<0,06	<0,06	133	<0,06	<0,06
56	<0,06	<0,06	136	<0,06	<0,06
59	<0,06	<0,06	138	<0,06	<0,06
61	<0,06	<0,06	140	<0,06	<0,06
63	<0,06	<0,06	143	<0,06	<0,06
66	<0,06	<0,06	145	<0,06	<0,06
68	<0,06	<0,06	147	<0,06	<0,06
70	<0,06	<0,06	150	<0,06	<0,06
73	<0,06	<0,06	152	<0,06	<0,06
75	<0,06	<0,06	154	<0,06	<0,06
77	<0,06	<0,06	157	<0,06	<0,06
80	<0,06	<0,06	159	<0,06	<0,06

Tabela C.4: Resultados de nitrito dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização (continuação).

Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
161	<0,06	<0,06	201	<0,06	<0,06
164	<0,06	<0,06	203	<0,06	<0,06
166	<0,06	<0,06	206	<0,06	<0,06
168	<0,06	<0,06	208	<0,06	<0,06
171	<0,06	<0,06	210	<0,06	<0,06
173	<0,06	<0,06	213	<0,06	<0,06
175	<0,06	<0,06	215	<0,06	<0,06
178	<0,06	<0,06	217	<0,06	<0,06
180	<0,06	<0,06	220	<0,06	<0,06
182	<0,06	<0,06	222	<0,06	<0,06
185	<0,06	<0,06	224	<0,06	<0,06
187	<0,06	<0,06	227	<0,06	<0,06
189	<0,06	<0,06	229	<0,06	<0,06
192	<0,06	<0,06	231	<0,06	<0,06
194	<0,06	<0,06	234	<0,06	<0,06
196	<0,06	<0,06	236	<0,06	<0,06
199	<0,06	<0,06			

Tabela C.5: Resultados de SST dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	MBBR-A		MBBR-H		MBBR-HA	
	SST (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SST (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SST (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão
8	68,6	6,4	79,5	7,2	82,1	8,4
15	59,3	7,1	63,2	4,7	76,9	5,5
22	38,1	5,2	37,9	5,5	53,5	6,3
29	34,5	4,9	45,7	4,1	32,7	6,0
36	25,4	4,3	38,5	3,2	23,0	4,2
43	16,3	3,1	32,7	3,6	25,7	2,4
50	13,8	2,3	30,5	4,7	19,4	3,3
57	17,6	1,8	29,6	2,8	16,4	2,9
64	12,5	2,4	18,2	3,1	20,5	4,1
71	14,0	3,8	15,8	5,3	22,4	3,6
78	13,9	1,5	14,4	4,1	19,0	1,5
85	16,4	2,9	13,9	3,6	16,7	2,7
92	14,2	1,7	15,7	2,8	21,6	1,9
99	13,8	3,6	19,2	1,3	15,7	0,8
106	11,0	4,0	16,3	2,4	19,3	3,9
113	12,5	1,4	18,4	3,1	22,3	4,4
120	14,3	2,5	19,0	2,6	24,6	2,7
127	13,1	3,2	15,6	3,3	17,1	1,6
134	11,5	1,1	13,0	4,4	23,6	2,2
141	15,2	3,7	16,3	2,4	22,2	3,8
148	13,8	3,4	15,8	1,3	18,8	1,2
155	15,3	2,6	15,1	2,7	22,6	3,5
162	13,7	2,3	18,4	3,6	17,4	2,6
169	16,8	3,1	19,9	3,8	19,8	3,1
176	13,6	3,0	15,8	2,7	15,7	2,0
183	16,5	2,9	14,3	2,0	21,0	3,7
190	15,5	4,4	16,3	1,6	23,7	1,8
197	11,8	3,6	17,1	3,2	19,2	3,4
204	10,5	2,3	15,7	3,8	21,6	2,9
211	12,4	2,6	16,4	2,7	14,5	3,1
218	14,0	3,1	16,8	1,6	18,2	1,7
225	14,5	3,7	15,2	2,0	22,5	2,0
232	12,5	4,5	15,7	3,2	23,9	3,1
239	15,7	3,1	13,6	1,9	15,4	2,6

Tabela C.6: Resultados de SSV dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	MBBR-A		MBBR-H		MBBR-HA	
	SSV (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SSV (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SSV (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão
8	62,4	8,1	63,6	9,1	73,9	7,2
15	55,7	6,3	53,1	5,2	70,7	5,5
22	33,9	4,8	34,1	6,1	51,4	3,9
29	31,0	5,2	37,0	4,3	28,1	5,2
36	24,4	3,6	31,2	3,9	18,4	2,8
43	14,5	4,1	28,4	5,5	22,1	3,1
50	13,1	3,3	25,0	4,6	17,3	3,3
57	16,0	2,9	24,6	3,3	13,6	1,9
64	11,5	3,0	15,3	2,6	17,6	0,6
71	13,0	4,2	12,6	3,5	17,9	2,9
78	12,8	3,6	13,0	3,8	15,4	2,0
85	15,4	4,0	11,4	4,4	14,2	2,3
92	13,5	0,6	12,6	2,1	17,3	3,0
99	12,5	2,3	15,5	3,7	12,9	1,4
106	9,7	1,5	13,2	0,7	16,8	4,2
113	12,0	2,7	15,6	1,9	19,6	3,9
120	13,6	3,2	16,9	3,4	20,4	2,8
127	12,0	1,7	14,0	2,6	14,2	2,2
134	10,9	2,5	10,4	2,5	18,9	3,1
141	14,1	2,6	13,4	2,7	19,1	3,0
148	12,9	1,8	13,7	3,3	15,8	2,1
155	13,6	2,3	13,7	3,1	18,6	3,1
162	12,7	3,9	14,9	1,8	15,1	2,9
169	15,3	4,5	16,5	2,4	18,0	3,3
176	11,9	2,2	13,7	3,3	13,2	2,1
183	14,1	2,7	11,4	1,5	16,8	1,8
190	13,1	3,1	14,5	3,2	20,4	2,9
197	10,5	3,7	16,2	2,0	17,1	2,3
204	9,9	1,9	13,3	2,8	17,9	3,1
211	11,2	0,8	13,3	1,5	12,3	3,5
218	13,0	2,3	14,3	3,0	16,0	2,4
225	12,3	4,1	12,2	2,2	18,0	3,1
232	10,9	3,3	12,6	1,7	20,3	2,6
239	13,5	4,4	11,1	2,2	13,1	3,0

Tabela C.7: Resultados de turbidez dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	Turbidez (UNT)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
8	7,8	9,9	7,5
15	6,7	7,1	8,7
22	5,3	6,6	5,4
29	1,9	4,1	4,3
36	2,3	4,4	4,7
43	3,7	4,4	4,0
50	4,1	3,9	3,4
57	5,5	5,5	2,8
64	6,3	1,9	3,7
71	4,2	3,3	2,2
78	3,9	4,1	3,6
85	4,6	4,4	2,7
92	3,5	4,9	2,3
99	2,3	3,2	4,3
106	2,9	2,5	3,3
113	3,4	3,8	2,1
120	5,7	1,9	2,7
127	4,5	2,2	2,0
134	2,3	3,3	2,5
141	3,4	2,8	2,8
148	3,0	4,0	3,2
155	2,8	3,7	2,6
162	3,3	2,2	2,8
169	3,0	2,7	2,4
176	2,9	3,5	3,0
183	2,7	4,6	4,1
190	3,0	3,5	4,4
197	3,2	3,9	3,9
204	2,8	2,5	3,7
211	3,2	2,7	3,6
218	3,6	3,1	2,8
225	2,1	3,3	4,3
232	2,8	2,4	3,3
239	3,2	3,0	2,6

Tabela C.8: Resultados de PS e PT do biofilme dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	PS (mg.L ⁻¹)			PT (mg.L ⁻¹)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
50	1,34	3,97	3,80	4,03	8,79	9,02
64	1,49	4,09	3,92	4,24	8,92	9,33
78	1,58	4,39	4,05	4,33	9,53	9,78
92	1,73	4,62	4,56	4,76	9,91	10,05
106	1,99	4,33	4,19	4,29	9,64	10,28
120	1,57	4,85	4,87	4,58	9,52	9,93
134	1,68	4,74	4,55	4,31	9,66	9,99
148	1,88	4,61	4,68	4,59	9,39	10,11
162	1,49	4,17	4,23	4,27	9,77	9,88
176	1,77	4,78	4,69	4,61	9,70	10,25
190	1,64	4,55	4,05	4,38	9,56	10,07
204	1,73	4,21	4,79	4,60	9,82	10,34
218	1,94	4,93	4,39	4,56	9,61	9,96
232	1,83	4,45	4,95	4,91	9,49	10,22

Tabela C.9: Resultados de biomassa seca aderida dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	Biomassa seca aderida (g)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
50	0,451	0,679	0,658
64	0,489	0,694	0,681
78	0,502	0,744	0,712
92	0,524	0,762	0,703
106	0,507	0,734	0,692
120	0,487	0,750	0,719
134	0,523	0,741	0,725
148	0,514	0,783	0,694
162	0,483	0,765	0,706
176	0,559	0,777	0,685
190	0,506	0,743	0,713
204	0,491	0,758	0,727
218	0,505	0,769	0,711
232	0,477	0,783	0,694

Tabela C.10: Resultados de pH dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	pH			Tempo de operação (d)	pH		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
10	6,70	6,68	6,89	82	6,92	6,88	6,77
12	7,08	6,86	6,86	84	6,95	6,91	6,74
14	6,88	6,77	6,90	86	7,02	6,87	6,75
16	6,94	6,81	6,84	88	6,94	6,85	6,73
18	6,55	6,74	6,85	90	6,97	6,77	6,93
20	6,52	6,81	6,79	92	6,86	6,81	6,90
22	7,03	6,77	6,75	94	6,80	6,83	6,91
24	6,72	6,69	6,78	96	6,75	6,86	6,88
26	6,86	6,84	6,84	98	7,05	6,92	6,89
28	6,64	6,82	6,84	100	6,73	6,90	6,84
30	6,59	6,88	6,88	102	6,92	6,90	6,87
32	6,88	6,70	6,90	104	6,85	6,88	6,92
34	6,82	6,70	6,89	106	6,91	6,75	6,91
36	6,67	6,82	6,87	108	6,89	6,70	6,88
38	6,89	6,81	6,83	110	6,70	6,71	6,85
40	6,58	6,76	6,80	112	7,04	6,76	6,83
42	6,51	6,80	6,79	114	6,99	6,74	6,82
44	6,75	6,81	6,74	116	6,91	6,79	6,91
46	6,70	6,92	6,78	118	6,93	6,80	6,90
48	6,66	6,84	6,90	120	6,89	6,83	6,88
50	6,83	6,76	6,85	122	7,02	6,82	6,89
52	6,64	6,84	6,92	124	6,87	6,77	6,84
54	6,82	6,70	6,94	126	6,82	6,79	6,82
56	6,50	6,77	6,87	128	6,93	6,75	6,79
58	7,01	6,70	6,89	130	6,88	6,81	6,74
60	6,74	6,85	6,85	132	6,84	6,83	6,73
62	6,77	6,88	6,81	134	6,91	6,84	6,85
64	6,69	6,73	6,80	136	7,06	6,81	6,86
66	7,03	6,76	6,83	138	6,95	6,90	6,88
68	6,72	6,68	6,82	140	6,98	6,89	6,91
70	6,50	6,80	6,79	142	6,70	6,88	6,93
72	6,73	6,78	6,77	144	6,62	6,82	6,90
74	6,74	6,77	6,81	146	6,84	6,84	6,89
76	6,89	6,73	6,80	148	6,99	6,79	6,86
78	6,95	6,75	6,75	150	6,93	6,77	6,78
80	6,82	6,81	6,78	152	6,73	6,69	6,77

Tabela C.10: Resultados de pH dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização (continuação).

Tempo de operação (d)	pH			Tempo de operação (d)	pH		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
154	6,64	6,77	6,81	200	6,82	6,88	6,90
156	6,83	6,78	6,88	202	6,99	6,83	6,89
158	6,84	6,73	6,92	204	6,84	6,81	6,85
160	6,97	6,88	6,93	206	6,78	6,77	6,87
162	6,83	6,83	6,90	208	6,97	6,76	6,86
164	6,91	6,84	6,88	210	6,88	6,74	6,83
166	6,86	6,89	6,87	212	7,05	6,78	6,85
168	6,91	6,87	6,91	214	6,94	6,82	6,81
170	6,84	6,81	6,89	216	6,87	6,80	6,88
172	6,88	6,82	6,86	218	6,94	6,88	6,87
174	6,93	6,85	6,88	218	6,94	6,91	6,92
176	7,00	6,78	6,85	220	7,04	6,89	6,85
178	6,81	6,77	6,84	222	6,92	6,86	6,83
180	6,77	6,73	6,79	224	6,85	6,83	6,82
182	6,93	6,83	6,77	226	6,96	6,84	6,86
184	7,06	6,85	6,76	228	6,88	6,83	6,81
186	6,89	6,88	6,87	230	6,87	6,79	6,77
188	6,93	6,89	6,85	232	6,98	6,84	6,79
190	6,99	6,92	6,89	234	6,89	6,86	6,74
192	6,88	6,90	6,88	236	7,01	6,85	6,80
194	6,77	6,85	6,90	238	6,98	6,88	6,84
196	6,80	6,87	6,93	240	6,69	6,89	6,88
198	6,98	6,84	6,92				

Tabela C.11: Resultados de temperatura dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização.

Tempo de operação (d)	T (°C)			Tempo de operação (d)	T (°C)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
10	25,0	25,4	25,3	82	22,1	22,0	22,4
12	25,5	25,2	25,5	84	22,0	22,1	21,9
14	24,7	24,8	24,5	86	21,6	21,4	21,5
16	24,2	24,2	24,0	88	21,3	21,3	21,3
18	24,7	24,6	24,5	90	21,0	21,2	20,9
20	23,5	23,3	23,4	92	20,1	20,3	20,0
22	25,4	25,4	25,6	94	20,6	20,5	20,4
24	23,0	22,8	23,1	96	20,3	20,3	20,1
26	25,4	25,3	25,4	98	20,6	20,4	20,3
28	24,3	24,4	24,2	100	22,0	22,1	21,8
30	25,7	25,6	25,5	102	21,6	21,4	21,4
32	24,6	24,5	24,6	104	23,7	23,6	23,4
34	23,3	23,2	23,4	106	23,4	23,5	23,2
36	22,5	22,4	22,5	108	21,2	21,1	21,4
38	24,6	24,5	24,3	110	20,9	20,7	21,0
40	24,0	24,1	23,8	112	21,6	21,5	21,3
42	23,1	23,3	23,0	114	21,3	21,4	21,0
44	22,8	22,7	22,8	116	21,4	21,2	21,2
46	22,1	22,0	22,0	118	21,0	21,3	20,9
48	22,3	22,4	22,6	120	20,6	20,5	20,7
50	22,0	22,2	21,8	122	20,3	20,2	20,0
52	22,4	22,2	22,3	124	22,5	22,3	22,3
54	21,7	21,5	21,5	126	22,4	22,5	22,7
56	21,8	21,6	21,8	128	21,7	21,5	21,4
58	22,0	22,1	22,2	130	21,3	21,3	21,0
60	21,3	21,4	21,1	132	22,3	22,4	22,2
62	20,6	20,4	20,6	134	22,4	22,0	22,2
64	20,5	20,6	20,3	136	21,0	21,2	20,9
66	19,9	19,9	19,7	138	22,6	22,5	22,6
68	20,9	20,6	20,7	140	23,1	23,1	23,0
70	20,1	20,0	19,8	142	20,2	20,0	20,4
72	20,2	20,4	20,3	144	22,2	22,0	22,1
74	20,3	20,3	20,4	146	22,7	22,5	22,9
76	20,5	20,6	20,2	148	21,2	21,0	21,0
78	21,5	21,4	21,6	150	21,7	21,6	21,8
80	21,4	21,2	21,3	152	21,5	21,5	21,5

Tabela C.11: Resultados de temperatura dos efluentes dos sistemas MBBR no período de estabilização (continuação).

Tempo de operação (d)	T (°C)			Tempo de operação (d)	T (°C)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
154	23,4	23,3	23,2	200	27,4	27,3	27,1
156	23,6	23,5	23,3	202	27,1	27,0	26,7
158	23,3	23,4	23,0	204	27,7	27,7	27,9
160	22,7	22,6	22,6	206	26,9	26,7	26,6
162	21,2	21,0	21,2	208	27,5	27,4	27,4
164	22,3	22,3	22,5	210	31,2	31,0	31,4
166	22,5	22,4	22,7	212	30,5	30,3	30,1
168	22,4	22,3	22,2	214	29,9	29,7	29,8
170	22,8	22,6	22,7	216	27,5	27,4	27,4
172	23,0	23,0	23,1	218	30,5	30,5	30,0
174	23,3	23,2	23,0	218	27,6	27,4	27,5
176	24,2	24,1	24,4	220	28,9	28,8	29,1
178	23,3	23,1	23,2	222	27,5	27,4	27,6
180	24,2	24,3	24,5	224	27,8	27,7	27,5
182	24,8	24,7	24,5	226	28,5	28,6	28,9
184	23,7	23,5	23,8	228	28,4	28,4	28,0
186	23,9	23,9	24,0	230	28,4	28,3	28,2
188	24,2	24,1	24,3	232	29,4	29,1	29,3
190	24,6	24,4	24,4	234	29,3	29,5	29,5
192	25,1	25,0	24,8	236	26,5	26,6	26,4
194	26,6	26,4	26,3	238	26,6	26,6	26,3
196	26,3	26,2	26,5	240	25,1	25,0	24,8
198	26,5	26,6	26,6				

Anexo D

Resultados após a adição dos estrogênios

Tabela D.1: Resultados de DQO solúvel dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
1	27	24	80	74	74
3	18	20	82	-	77
5	21	27	85	74	85
8	25	26	87	78	89
10	31	23	89	72	88
12	24	19	92	69	81
15	30	22	94	76	83
17	18	25	96	75	76
19	21	23	99	77	79
22	34	27	101	68	88
24	29	22	103	76	79
26	38	19	106	79	90
29	31	21	108	76	86
31	24	23	110	67	85
33	33	27	113	66	87
36	27	23	115	71	83
38	21	34	117	78	77
40	33	47	120	75	79
43	37	43	122	70	77
45	47	64	124	75	81
47	53	77	127	77	80
50	77	86	129	68	83
52	77	82	131	82	86
54	80	80	134	79	79
57	69	74	136	77	86
59	72	77	138	73	81
61	77	86	141	72	85
64	70	84	143	69	83
66	69	80	145	75	89
68	75	75	148	77	85
71	77	77	150	70	81
73	72	81	152	73	78
75	70	83	155	79	89
78	77	85	157	87	95

Tabela D.1: Resultados de DQO solúvel dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios (continuação).

Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	DQO _s (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
159	99	109	201	155	161
162	113	128	204	157	163
164	154	141	206	151	168
166	160	158	208	150	162
169	155	164	211	163	157
171	153	160	213	157	155
173	157	155	215	156	163
176	147	158	218	155	169
178	155	163	220	155	167
180	158	167	222	158	163
183	143	166	225	152	154
185	156	163	227	154	157
187	153	165	229	148	161
190	161	160	232	154	166
192	158	169	234	153	164
194	150	167	236	162	158
197	147	156	239	157	156
199	153	157			

Tabela D.2: Resultados de nitrogênio amoniacal dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
1	12,9	7,4	80	14,6	7,5
3	22,5	9,5	82	11,1	8,1
5	24,4	12,3	85	18,3	9,3
8	29,3	15,3	87	18,8	10,1
10	33,0	19,3	89	13,8	9,8
12	35,0	22,4	92	12,1	8,1
15	48,8	27,5	94	17,7	8,8
17	58,0	31,8	96	21,1	9,2
19	78,3	37,1	99	11,7	10,2
22	69,1	33,9	101	14,7	12,3
24	53,5	27,1	103	12,6	10,8
26	44,1	21,0	106	17,4	9,9
29	39,4	17,2	108	19,5	11,0
31	27,1	15,6	110	12,7	10,7
33	15,9	13,2	113	15,0	9,2
36	17,9	9,9	115	16,9	12,2
38	10,5	8,1	117	13,2	9,5
40	12,3	7,7	120	10,5	9,7
43	13,4	11,8	122	14,2	15,5
45	15,9	9,3	124	40,2	21,1
47	17,2	8,8	127	39,3	19,2
50	15,0	7,4	129	27,3	16,7
52	13,9	9,1	131	22,8	14,4
54	10,3	10,6	134	16,3	13,2
57	17,2	8,5	136	17,2	10,7
59	14,8	8,3	138	15,1	11,1
61	13,0	7,4	141	19,3	13,7
64	19,5	7,8	143	12,9	10,2
66	15,9	8,3	145	17,0	9,6
68	10,8	9,0	148	15,9	10,5
71	16,4	10,3	150	13,2	9,9
73	17,1	10,0	152	19,6	10,7
75	13,2	9,5	155	18,7	8,9
78	16,7	7,3	157	15,8	9,2

Tabela D.2: Resultados de nitrogênio amoniacal dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênicos (continuação).

Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
159	13,4	9,5	201	19,2	10,1
162	18,5	9,1	204	20,6	9,5
164	17,3	10,0	206	16,3	9,9
166	19,6	13,2	208	13,9	9,1
169	18,4	12,7	211	20,4	9,7
171	16,5	12,2	213	19,4	10,1
173	12,8	11,8	215	15,0	10,5
176	18,9	12,4	218	14,7	9,6
178	17,3	11,6	220	17,5	9,9
180	16,2	11,3	222	13,7	10,6
183	18,3	10,7	225	19,1	11,0
185	19	11,5	227	20,1	10,5
187	20,1	11,8	229	17,0	10,2
190	18,7	12,3	232	16,3	9,7
192	15,8	10,2	234	14,9	9,3
194	19,5	10,5	236	17,2	10,1
197	15,3	11,7	239	17,9	10,4
199	17,4	12,2			

Tabela D.3: Resultados de nitrato dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
1	154	13,24	80	156	9,33
3	146	9,91	82	144	11,80
5	124	7,51	85	152	9,83
8	96	5,83	87	141	10,99
10	74	4,44	89	138	10,42
12	72	3,36	92	161	10,32
15	64	2,87	94	142	9,70
17	32	2,55	96	140	11,07
19	33	4,19	99	154	10,03
22	64	5,79	101	144	10,64
24	73	7,81	103	142	9,80
26	92	10,12	106	153	9,58
29	116	12,55	108	139	9,24
31	123	9,93	110	146	10,92
33	143	9,56	113	157	10,18
36	141	10,02	115	137	9,72
38	171	9,91	117	150	9,95
40	141	10,32	120	144	12,17
43	160	11,78	122	156	10,41
45	152	10,67	124	101	11,56
47	136	11,32	127	96	11,18
50	156	10,43	129	120	10,75
52	154	10,19	131	140	10,21
54	144	9,83	134	148	9,77
57	149	9,49	136	136	12,12
59	140	9,77	138	156	12,40
61	150	10,34	141	146	11,78
64	151	10,58	143	145	11,32
66	142	10,82	145	155	12,81
68	162	11,07	148	164	12,16
71	148	12,30	150	161	10,45
73	152	11,89	152	146	9,21
75	145	11,44	155	144	9,61
78	143	10,86	157	152	12,30

Tabela D.3: Resultados de nitrato dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios (continuação).

Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
159	161	11,67	201	166	11,43
162	146	11,55	204	159	10,94
164	153	10,86	206	155	11,43
166	139	12,40	208	149	10,35
169	163	11,23	211	143	10,98
171	153	11,92	213	141	10,12
173	165	10,98	215	147	9,88
176	142	10,73	218	157	9,54
178	150	9,35	220	148	9,21
180	148	9,93	222	156	9,48
183	141	11,41	225	153	10,03
185	152	10,89	227	145	10,26
187	150	11,14	229	153	10,50
190	164	9,63	232	148	10,74
192	147	11,65	234	159	9,99
194	148	12,95	236	151	12,33
197	158	10,52	239	140	10,27
199	148	12,04			

Tabela D.4: Resultados de nitrito dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-A	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-HA
1	<0,06	<0,06	80	<0,06	<0,06
3	1,15	0,58	82	<0,06	<0,06
5	3,46	1,83	85	<0,06	<0,06
8	7,30	3,75	87	<0,06	<0,06
10	19,12	9,66	89	<0,06	<0,06
12	34,20	17,21	92	<0,06	<0,06
15	53,46	26,73	94	<0,06	<0,06
17	75,28	36,03	96	<0,06	<0,06
19	33,80	13,21	99	<0,06	<0,06
22	12,90	6,37	101	<0,06	<0,06
24	6,10	2,95	103	<0,06	<0,06
26	<0,06	<0,06	106	<0,06	<0,06
29	<0,06	<0,06	108	<0,06	<0,06
31	<0,06	<0,06	110	<0,06	<0,06
33	<0,06	<0,06	113	<0,06	<0,06
36	<0,06	<0,06	115	<0,06	<0,06
38	<0,06	<0,06	117	<0,06	<0,06
40	<0,06	<0,06	120	<0,06	<0,06
43	<0,06	<0,06	122	<0,06	<0,06
45	<0,06	<0,06	124	<0,06	<0,06
47	<0,06	<0,06	127	<0,06	<0,06
50	<0,06	<0,06	129	<0,06	<0,06
52	<0,06	<0,06	131	<0,06	<0,06
54	<0,06	<0,06	134	<0,06	<0,06
57	<0,06	<0,06	136	<0,06	<0,06
59	<0,06	<0,06	138	<0,06	<0,06
61	<0,06	<0,06	141	<0,06	<0,06
64	<0,06	<0,06	143	<0,06	<0,06
66	<0,06	<0,06	145	<0,06	<0,06
68	<0,06	<0,06	148	<0,06	<0,06
71	<0,06	<0,06	150	<0,06	<0,06
73	<0,06	<0,06	152	<0,06	<0,06
75	<0,06	<0,06	155	<0,06	<0,06
78	<0,06	<0,06	157	<0,06	<0,06

Tabela D.4: Resultados de nitrito dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios (continuação).

Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)		Tempo de operação (d)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	
	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-H	MBBR-HA
159	<0,06	<0,06	201	<0,06	<0,06
162	<0,06	<0,06	204	<0,06	<0,06
164	<0,06	<0,06	206	<0,06	<0,06
166	<0,06	<0,06	208	<0,06	<0,06
169	<0,06	<0,06	211	<0,06	<0,06
171	<0,06	<0,06	213	<0,06	<0,06
173	<0,06	<0,06	215	<0,06	<0,06
176	<0,06	<0,06	218	<0,06	<0,06
178	<0,06	<0,06	220	<0,06	<0,06
180	<0,06	<0,06	222	<0,06	<0,06
183	<0,06	<0,06	225	<0,06	<0,06
185	<0,06	<0,06	227	<0,06	<0,06
187	<0,06	<0,06	229	<0,06	<0,06
190	<0,06	<0,06	232	<0,06	<0,06
192	<0,06	<0,06	234	<0,06	<0,06
194	<0,06	<0,06	236	<0,06	<0,06
197	<0,06	<0,06	239	<0,06	<0,06
199	<0,06	<0,06			

Tabela D.5: Resultados de SST dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	MBBR-A		MBBR-H		MBBR-HA	
	SST (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SST (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SST (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão
6	15,2	4,6	14,8	4,3	19,4	4,5
13	34,0	6,2	135	5,5	59,2	9,6
20	79,5	7,1	293	22,9	167	13,2
27	190	13,1	374	17,3	259	14,6
34	231	36,9	351	20,5	314	16,6
41	209	19,0	327	13,1	283	23,3
48	194	13,8	319	26,9	275	16,5
55	172	18,9	302	10,0	266	12,9
62	164	23,1	284	7,8	259	4,9
69	154	17,6	309	20,9	275	17,0
76	179	10,7	296	17,0	280	6,6
83	181	9,3	311	2,8	261	11,4
90	172	14,7	296	19,7	277	13,4
97	157	16,3	291	13,4	275	13,0
104	150	12,6	316	8,8	263	18,0
111	178	11,2	309	14,2	255	12,2
118	152	13,9	301	19,1	272	15,3
125	179	10,7	289	5,42	277	11,1
132	237	9,6	372	18,1	315	16,5
139	255	14,3	412	14,5	387	14,6
146	249	11,9	452	13,8	391	9,8
153	231	15,6	439	9,3	377	17,3
160	247	12,3	418	11,0	371	19,2
167	261	11,2	392	23,5	383	22,0
174	234	8,7	399	17,4	390	13,7
181	247	7,3	427	7,9	385	19,2
188	251	9,2	414	5,7	377	15,0
195	230	12,3	389	12,7	373	12,9
202	245	14,2	394	11,3	384	10,1
209	247	11,7	417	19,2	389	11,7
216	239	10,6	421	13,3	370	20,1
223	227	13,0	429	21,7	381	18,0
230	241	11,1	416	13,6	368	13,2
237	233	9,4	408	9,9	376	11,6

Tabela D.6: Resultados de SSV dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	MBBR-A		MBBR-H		MBBR-HA	
	SSV (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SSV (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	SSV (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão
6	12,2	4,1	12,14	3,3	16,5	4,3
13	27,6	5,3	110	9,3	52,7	8,8
20	65,2	8,1	270	15,3	159	9,1
27	171	11,3	307	19,7	233	11,7
34	208	35,0	337	17,0	295	8,3
41	169	13,0	294	13,5	263	12,3
48	173	17,0	297	11,6	247	15,5
55	146	22,0	278	8,4	255	10,5
62	144	29,0	253	8,3	223	7,4
69	128	14,0	278	15,8	242	17,8
76	157	9,6	281	13,0	255	6,1
83	170	12,5	280	2,5	245	8,2
90	155	11,2	281	16,7	249	10,3
97	130	6,8	271	11,7	261	9,3
104	139	15,2	262	7,1	245	17,7
111	169	10,2	272	11,4	227	10,1
118	129	10,8	256	14,2	226	9,4
125	143	5,9	269	2,6	258	12,5
132	197	6,0	335	14,4	283	13,7
139	219	4,1	391	9,5	364	10,7
146	222	9,9	407	12,8	356	10,6
153	196	13,6	408	10,1	335	15,2
160	202	15,0	372	14,5	315	17,5
167	232	11,2	361	19,2	352	19,2
174	220	14,3	383	13,2	351	12,7
181	222	9,3	384	8,1	366	16,4
188	208	11,0	377	6,6	347	14,2
195	200	16,0	369	11,9	347	9,4
202	201	10,5	370	9,9	326	8,4
209	227	9,4	350	13,7	342	12,3
216	227	13,2	375	14,2	344	18,2
223	200	11,8	365	16,0	343	15,3
230	205	8,4	387	15,1	339	10,8
237	203	13,5	392	8,4	342	8,6

Tabela D.7: Resultados de turbidez dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	Turbidez (UNT)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
6	3,86	10,14	9,67
13	8,94	9,98	8,26
20	5,83	7,30	10,09
27	6,32	11,12	6,02
34	4,10	7,13	5,11
41	3,23	3,98	4,19
48	4,77	4,75	2,64
55	4,12	3,21	2,93
62	3,97	3,90	3,42
69	4,17	3,22	3,57
76	6,09	2,04	3,69
83	5,29	2,60	2,76
90	4,50	3,27	4,81
97	2,91	4,09	3,66
104	1,92	3,40	2,31
111	3,82	2,13	2,44
118	2,95	2,70	2,83
125	4,85	4,29	5,41
132	1,16	5,04	4,78
139	2,78	5,76	3,47
146	4,06	4,91	3,25
153	3,82	3,77	2,99
160	2,55	3,30	2,53
167	4,12	3,64	2,87
174	3,91	2,92	3,01
181	3,75	2,20	3,88
188	2,93	3,67	3,29
195	3,81	3,93	3,87
202	3,99	2,71	4,21
209	4,25	3,30	3,55
216	2,94	4,20	2,57
223	2,83	3,82	2,95
230	3,11	2,95	3,51
237	3,15	4,42	2,71

Tabela D.8: Resultados de PS e PT do biofilme dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	PS (mg.L ⁻¹)			PT (mg.L ⁻¹)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
6	1,71	5,16	5,16	4,80	13,13	11,38
20	9,80	17,32	19,27	32,26	48,97	53,78
34	32,63	23,22	22,50	98,11	69,33	78,01
48	28,51	24,88	22,45	77,26	51,76	51,21
62	18,51	21,70	19,61	48,11	48,49	45,87
76	16,45	22,99	20,95	45,33	49,22	47,88
90	17,98	19,89	21,09	50,50	46,71	48,01
104	18,22	23,81	22,94	48,20	53,29	55,4
118	16,76	17,80	21,82	41,97	42,78	50,11
132	22,17	19,42	23,58	55,92	63,8	66,32
146	26,34	20,86	19,26	66,1	55,23	57,02
160	21,89	22,88	22,96	59,2	61,3	53,99
174	23,76	19,02	23,76	56,9	52,8	57,09
188	24,55	20,09	19,47	63,88	57,8	52,88
202	23,98	19,29	20,87	66,29	50,11	55,19
216	22,80	21,10	17,90	57,2	56,24	49,01
230	24,77	22,37	21,23	58,3	57,99	60,03

Tabela D.9: Resultados de biomassa seca aderida dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	Biomassa seca aderida (g)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
6	0,659	0,982	0,836
20	1,488	1,646	1,599
34	1,937	2,589	2,374
48	1,543	2,403	2,271
62	1,474	2,283	2,118
76	1,390	2,004	1,943
90	1,355	2,143	1,902
104	1,413	1,976	2,106
118	1,341	2,021	1,955
132	1,437	2,235	2,001
146	2,113	2,743	2,793
160	2,257	3,132	3,029
174	2,202	3,009	2,780
188	1,791	2,994	2,521
202	1,935	2,638	2,404
216	1,979	2,891	2,560
230	1,891	2,775	2,322

Tabela D.10: Resultados de pH dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	pH			Tempo de operação (d)	pH		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
2	6,88	6,92	6,62	74	6,86	6,93	6,84
4	6,61	6,90	6,58	76	6,74	6,95	6,75
6	6,94	6,85	6,88	78	6,85	6,89	6,88
8	6,76	6,92	6,84	80	6,88	6,98	6,92
10	6,80	6,96	6,64	82	6,70	6,73	6,89
12	6,72	6,85	6,72	84	6,76	6,84	6,84
14	6,51	6,84	6,59	86	7,08	6,80	6,72
16	6,86	6,93	6,58	88	7,00	6,78	6,51
18	6,88	6,96	6,88	90	6,95	6,94	6,86
20	6,69	6,90	6,80	92	6,93	6,82	6,88
22	6,73	6,87	6,92	94	6,90	6,93	6,67
24	6,66	6,79	6,88	96	6,84	6,97	6,75
26	6,74	6,98	6,91	98	6,88	6,99	6,89
28	6,76	6,93	6,94	100	6,96	6,94	6,62
30	6,89	6,89	6,71	102	7,05	6,88	6,58
32	6,92	6,82	6,83	104	7,02	6,73	6,88
34	6,55	6,91	6,72	106	6,84	6,77	6,84
36	6,92	6,52	6,89	108	6,77	6,84	6,75
38	6,52	6,51	6,69	110	6,95	6,87	6,86
40	6,85	6,79	6,70	112	6,99	6,80	6,91
42	7,03	6,75	6,79	114	6,82	6,82	6,92
44	6,75	6,71	6,75	116	6,71	6,96	6,75
46	6,69	6,70	6,71	118	6,53	6,99	6,82
48	6,82	6,64	6,70	120	7,03	6,81	6,92
50	6,68	6,91	6,77	122	7,02	6,91	6,85
52	6,50	6,83	6,84	124	6,72	6,74	6,75
54	6,89	6,81	6,87	126	6,89	6,93	6,79
56	7,01	6,74	6,89	128	6,69	6,97	6,82
58	6,50	6,77	6,85	130	6,70	6,92	6,68
60	6,58	6,95	6,70	132	6,60	6,86	6,73
62	6,66	6,93	6,76	134	7,04	6,95	6,84
64	6,72	6,99	6,84	136	6,86	6,70	6,80
66	6,83	6,90	6,88	138	6,93	6,92	6,78
68	6,92	6,85	6,97	140	6,80	6,83	6,86
70	6,64	6,89	6,91	142	6,74	6,94	6,83
72	6,70	6,86	6,94	144	6,75	6,94	6,80

Tabela D.10: Resultados de pH dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios (continuação).

Tempo de operação (d)	pH			Tempo de operação (d)	pH		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
146	6,86	6,99	6,74	196	6,88	6,77	6,70
148	6,91	6,87	6,91	198	6,97	6,73	6,86
150	6,99	6,83	6,82	200	6,91	6,99	6,74
152	6,64	6,94	6,73	202	6,94	6,92	6,85
154	6,72	7,01	6,79	204	6,84	6,95	6,88
156	6,59	6,99	6,98	206	6,75	6,73	6,69
158	6,58	6,98	6,93	208	6,88	6,70	6,73
160	6,88	6,78	6,89	210	6,92	6,59	6,66
162	6,80	6,69	6,82	212	6,89	6,62	6,74
164	6,92	6,99	6,91	214	6,84	6,86	6,76
166	6,98	6,73	6,85	216	7,02	6,84	6,89
168	6,99	6,93	6,89	218	6,91	7,05	6,84
170	6,82	6,79	6,84	218	6,82	6,88	6,77
172	6,77	6,73	6,91	220	6,73	6,78	6,95
174	6,99	6,58	6,83	222	6,67	6,94	6,99
176	6,92	6,96	6,81	224	6,75	6,82	6,82
178	6,95	7,04	6,74	226	6,89	6,88	6,85
180	6,93	6,84	6,77	228	6,62	6,80	6,76
182	6,97	6,83	6,82	230	6,58	6,92	6,74
184	6,88	6,90	6,77	232	6,88	6,98	6,76
186	6,99	6,91	6,66	234	6,84	6,88	6,89
188	6,84	6,82	6,72	236	6,93	6,69	6,92
190	6,93	6,86	6,83	238	6,97	6,73	6,90
192	6,91	6,95	6,92	240	6,99	6,66	6,84
194	6,84	7,05	6,64				

Tabela D.11: Resultados de temperatura dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios.

Tempo de operação (d)	T (°C)			Tempo de operação (d)	T (°C)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
2	26,4	26,3	26,4	74	30,4	30,3	30,3
4	26,3	26,0	26,1	76	30,5	30,5	30,3
6	26,8	26,7	26,9	78	29,7	29,6	29,9
8	26,5	26,3	26,4	80	28,4	28,3	28,2
10	27,1	27,1	26,9	82	28,7	28,8	28,9
12	27,4	27,2	27,4	84	28,4	28,3	28,4
14	26,7	26,5	26,8	86	29,1	29,0	28,9
16	27,1	27,0	26,9	88	29,4	29,5	29,6
18	27,4	27,4	27,0	90	30,5	30,5	30,3
20	27,7	27,6	27,9	92	29,3	29,4	29,1
22	29,9	29,9	29,7	94	32,4	32,4	32,5
24	28,1	28,0	27,9	96	26,5	26,1	26,3
26	27,5	27,6	27,4	98	27,9	27,8	27,8
28	27,9	27,7	28,0	100	26,6	26,4	26,5
30	27,6	27,5	27,5	102	31,9	31,8	31,7
32	28,6	28,6	28,7	104	25,1	25,3	25,2
34	28,9	29,0	28,9	106	24,5	24,6	24,5
36	27,1	27,0	26,8	108	25,0	25,1	24,9
38	27,5	27,4	27,2	110	24,5	24,3	24,3
40	27,4	27,3	27,3	112	25,5	25,2	25,4
42	27,8	27,9	27,7	114	24,3	24,3	24,0
44	28,3	28,3	28,0	116	24,7	24,8	24,5
46	28,5	28,4	28,7	118	24,5	24,6	24,8
48	27,1	27,1	27,0	120	24,2	24,3	24,1
50	24,5	24,6	24,6	122	24,5	24,5	24,3
52	24,6	24,5	24,4	124	24,7	24,5	24,7
54	24,9	24,7	24,8	126	24,6	24,7	24,5
56	25,1	25,0	24,8	128	23,5	23,2	23,1
58	25,0	25,1	24,9	130	24,9	24,7	25,0
60	26,6	26,4	26,5	132	25,4	25,3	25,3
62	26,5	26,4	26,4	134	24,5	24,6	24,3
64	26,9	26,7	26,9	136	23,3	23,5	23,4
66	27,3	27,4	27,2	138	22,9	22,8	23,0
68	27,5	27,6	27,5	140	22,5	22,6	22,8
70	30,1	29,9	29,9	142	23,8	23,9	23,6
72	31,2	31,0	30,9	144	24,6	24,5	24,4

Tabela D.11: Resultados de temperatura dos efluentes dos sistemas MBBR após adição dos estrogênios (continuação).

Tempo de operação (d)	T (°C)			Tempo de operação (d)	T (°C)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA		MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
146	24,3	24,3	24,2	196	20,6	20,9	20,7
148	24,0	24,2	24,3	198	23,4	23,5	23,2
150	23,9	23,7	23,5	200	22,8	22,9	23,0
152	23,1	23,0	23,3	202	22,5	22,6	22,8
154	23,0	22,8	22,9	204	22,1	22,4	22,4
156	24,9	24,7	24,6	206	22,4	22,6	22,5
158	25,4	25,4	25,3	208	22,3	22,2	22,0
160	24,5	24,3	24,4	210	22,3	22,4	22,3
162	24,3	24,1	24,1	212	22,0	22,2	22,1
164	24,9	24,8	24,7	214	22,3	22,5	22,5
166	25,7	25,8	26,0	216	22,4	22,0	22,6
168	25,1	25,0	25,4	218	21,0	21,3	21,4
170	24,6	24,5	24,3	218	21,7	21,6	21,7
172	23,8	23,9	24,0	220	21,6	21,8	21,9
174	22,2	22,0	21,9	222	21,8	22,1	22,0
176	22,0	22,3	22,0	224	21,6	21,7	21,6
178	20,8	20,9	21,1	226	22,0	22,4	22,3
180	21,3	21,2	21,0	228	22,7	22,8	23,1
182	20,8	20,9	21,0	230	21,6	21,7	21,9
184	20,6	20,7	20,9	232	22,3	22,4	22,3
186	20,9	20,7	20,7	234	23,7	23,9	23,8
188	20,5	20,6	20,4	236	22,7	22,7	22,5
190	20,3	20,5	20,5	238	23,4	23,5	23,6
192	20,9	20,7	21,0	240	22,0	22,4	22,5
194	21,3	21,3	21,2				

Tabela D.12: Concentrações de E2 nos efluentes dos sistemas MBBR.

Tempo de operação (d)	E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
6	5	20	5
20	11	69	11
34	45	37	32
48	61	71	51
62	39	50	39
76	55	67	45
90	49	21	19
104	53	60	42
118	36	53	36
132	25	107	74
146	79	67	36
160	37	73	17
174	92	79	88
188	50	62	77
202	95	48	33
216	76	51	16
230	22	35	39

Tabela D.13: Concentrações de EE2 nos efluentes dos sistemas MBBR.

Tempo de operação (d)	EE2 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
6	112	238	157
20	134	299	258
34	211	294	297
48	197	313	271
62	188	352	234
76	231	278	278
90	174	325	259
104	180	287	302
118	256	279	279
132	198	298	301
146	239	317	269
160	204	294	341
174	234	313	248
188	152	352	239
202	178	300	303
216	175	365	275
230	187	347	295

Tabela D.14: Concentrações de E1 nos efluentes dos sistemas MBBR.

Tempo de operação (d)	E1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	MBBR-A	MBBR-H	MBBR-HA
6	11	24	31
20	32	82	74
34	69	101	103
48	72	118	101
62	69	115	106
76	77	118	110
90	75	102	112
104	72	106	105
118	81	111	113
132	62	106	118,3
146	59	96	84,3
160	40	92	88,5
174	46	87	87,8
188	40	84	91,3
202	41	80	86,6
216	45	88	80,0
230	37	77	89,3