
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

JOSSY KARLA BRASIL BERNARDELLI

**BIODEGRADAÇÃO DE ESTRONA, 17B-ESTRADIOL E 17A-
ETINILESTRADIOL EM SISTEMAS AERÓBIOS DE
TRATAMENTO**

**FLORIANÓPOLIS
2014**

Josy Karla Brasil Bernardelli

**BIODEGRADAÇÃO DE ESTRONA, 17B-ESTRADIOL E 17A-
ETINILESTRADIOL EM SISTEMAS AERÓBIOS DE
TRATAMENTO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr Flávio Rubens Lapolli,

Florianópolis
2014

Jossy Karla Brasil Bernardelli

**BIODEGRADAÇÃO DE ESTRONA, 17B-ESTRADIOL E 17A-
ETINILESTRADIOL EM SISTEMAS AERÓBIOS DE
TRATAMENTO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Ambiental”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental.

Florianópolis, 18 de dezembro de 2014.

Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Coordenador do Programa de Pós Graduação em Eng. Ambiental)

Banca Examinadora:

Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Miguel Mansur Aisse, Dr.
Universidade Federal do Paraná

Prof. Sérgio Francisco de Aquino,
Dr.
Universidade Federal de Ouro Preto-MG

Prof. Maria Eliza Nagel Hassemer,
Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Cátia Regina Silva de
Carvalho Pinto, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Rejane Helena Ribeiro da
Costa, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho ao meu grande amor Euclides e aos meus queridos pais José e Cida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Flávio Rubens Lapolli, por sempre me receber de braços abertos e por possibilitar a realização deste trabalho.

Aos membros da banca professores Sérgio F. de Aquino, Miguel M. Aisse, Maria Eliza N. Hassemer, Rejane H. R. da Costa e Cátia R. S. de Carvalho Pinto, pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

Ao Laboratório de Reúso de Águas (LaRA) e ao Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA) por oferecer toda a estrutura necessária.

Ao Laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Técnicas Avançadas para o Tratamento de Resíduos (TECNOTRATER), do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) onde foram realizadas as análises para determinação da concentração de hormônios.

As agências de financiamento do projeto, FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos e CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Ao PPGEA - Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao professor Patricio G. Peralta Zamora por ceder toda a estrutura de seu laboratório possibilitando a realização das análises cromatográficas.

Ao professor Marcus V. de Liz por confiar e acreditar no meu trabalho, por me ensinar todos os passos para operar o cromatógrafo e por toda ajuda na elaboração do artigo.

Aos professores do PPGEA pelo conhecimento transmitido nas disciplinas e pelo apoio.

A professora Maria Ángeles L. Recio pela grande contribuição na elaboração do artigo e por todas as orientações.

Ao colega Rafael Dutra de Armas por me ajudar a definir o caminho a ser seguido e nas análises moleculares em vários momentos.

Aos amigos do LaRA, Cristiane Fozke, Marie Chéry, Jacqueline Vistuba, Tiago Guedes, Pauline Amaral, Ronaldo Kellner, Marcelo Bueno, André Battistelli, Naiara Justino, Fernanda Poersch, Dámaris Núñez, Rayra Costa, Eduardo Ribeiro, pelo incentivo, ajuda, paciência e carinho.

Aos amigos do PPGEA Marina Tateoka, Dani Damasceno, Heloísa Fernandes, Catiane Pelissari, Jamile Wagner, Wanderli Leite.

As estagiárias Luiza Jofily, Joana André, Marina Laus, Franciele dos Santos por todo o apoio no laboratório.

Ao amigo Tiago Belli, por ter me ajudado desde o início e principalmente por cuidar dos meus reatores e por transmitir todo conhecimento adquirido.

A amiga Caroline Rodrigues, por todo empenho e dedicação em sempre fazer o melhor.

A amiga Lucila Coral, por ser minha grande amiga e me ajudar sempre em todos os momentos.

A amiga Lorena Guimarães pela amizade e por todo o apoio e incentivo nas análises moleculares.

A amiga Juliana Schontag pela amizade e pelos momentos incríveis em Portugal, e por ceder carinhosamente sua casa.

Aos amigos de Floripa, Danielle Fernandes, Fabio Knevez, Luiz Vieira, pelos momentos de descontração.

Ao meu amado esposo Euclides A. Bernardelli, por estar sempre me incentivado, apoiando e ajudando, até na operação dos reatores, e por sempre encontrar uma maneira mais fácil de encarar os problemas.

Aos meus pais José P. Brasil e Maria Aparecida M. Brasil por toda dedicação, preocupação e carinho a mim dedicados em toda minha vida.

A Deus, pela vida e por me permitir viver ao lado de pessoas maravilhosas.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

RESUMO

Os estrogênios, presentes no meio aquático como contaminantes e classificados como desreguladores endócrinos, são substâncias com comprovado efeito maléfico aos ecossistemas aquáticos e aos seres vivos, portanto, torna-se necessária a remoção destes poluentes dos esgotos sanitários. Com isto, neste trabalho foi avaliada a remoção simultânea dos hormônios estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em condições aeróbias. Neste contexto, foram realizados ensaios de bancada aeróbios de curta duração, conduzidos em diferentes condições operacionais (três concentrações de sólidos suspensos voláteis e da fonte de carbono, três tipos de meio aquoso, lodo inativado e lodo ativado proveniente de três plantas de tratamento diferentes), com o intuito de verificar a relação destas variáveis com a remoção dos hormônios. Além disso, um reator de enriquecimento foi monitorado, para verificar a degradação dos estrogênios a partir da microbiota, sendo que a única fonte de carbono externa adicionada ao sistema foram os hormônios (E1, E2 e EE2). Por fim, dois sistemas piloto de tratamento de esgoto sanitário, lodos ativados (LA) e biorreator a membrana (MBR), foram monitorados para observar a degradação ou a remoção da fase aquosa dos poluentes de interesse. O E2 foi degradado mais facilmente em todos os casos avaliados. Nos experimentos com o lodo inativado, o composto sintético EE2 foi removido mais rapidamente, pelo processo de adsorção, do que os compostos naturais. Um consórcio bacteriano foi obtido através do enriquecimento, e a sua capacidade de degradação foi comprovada. A diversidade da comunidade bacteriana presente em cada amostra de lodo foi estudada, possibilitando a comparação da diversidade das bactérias dominantes, existentes em cada um dos sistemas. Os reatores LA e MBR apresentaram eficiência de remoção dos hormônios bastante semelhante, sugerindo que a presença da membrana como forma de retenção da biomassa no sistema, pode ser substituída por sistemas mais simplificados como os lodos ativados operados em batelada sequencial. A ocorrência do processo de nitrificação foi o principal fator relacionado à eficiência de remoção dos hormônios observada neste trabalho.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos. Estrona. 17 β -estradiol. 17 α -etinilestradiol. Remoção de hormônios. Biorreator à membrana. Lodos ativados.

ABSTRACT

The estrogens, present in the aquatic environment as contaminants and classified as endocrine disrupting compounds, are substances with proven harmful effects to the aquatic ecosystems, therefore, it becomes necessary to remove these pollutants from sewage. Thus, the simultaneous removal of the hormones estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) under aerobic conditions were evaluated in this work. In this context, aerobic batch tests of short duration, conducted under different operating conditions (three concentrations of volatile suspended solids and carbon source, three types of aqueous media, deactivated sludge and activated sludge from three different plants) were performed, in order to verify the relationship between these variables with the estrogens removal. Moreover, an enrichment reactor was monitored, to check the degradation of estrogens from the microbiota, whereas the hormones were the only external carbon source added to the system. Finally, two systems of wastewater treatment, activated sludge (AS) and membrane bioreactor (MBR), were monitored to observe the degradation or elimination from the aqueous phase of the pollutants of interest. The E2 was more easily degraded in all cases evaluated. In experiments with the sludge inactivated, the synthetic compound EE2 was more quickly removed by adsorption than the natural compounds. A bacterial consortium was obtained by enrichment, and its degradation capacity was proven. The structure of bacterial communities present in each sample was studied, allowing comparison of the diversity of dominant bacteria present in each system. The reactors AS and MBR showed removal efficiency hormones quite similar, suggesting that the presence of the membrane retains the biomass in the system, can be replaced by a more simplified system such as activated sludge sequencing batch reactor. The occurrence of the nitrification process was the main factor related to the removal efficiency of hormones observed in this work.

Keywords: Endocrine disrupting compounds. Estrone. 17 β -estradiol. 17 α -ethinylestradiol. Hormones removal. Membrane bioreactor. Activated sludge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura química da estrona (a), estriol (b), 17 β -estradiol (c) e 17 α -etinilestradiol (d).....	43
Figura 2.2 - Rotas de exposição humana e contaminação por hormônios.....	44
Figura 2.3 – Principais processos envolvidos na remoção dos estrogênios.....	47
Figura 2.4 – Representação esquemática das etapas envolvidas no processo de tratamento por lodos ativados em batelada sequencial.	59
Figura 3.1 - Representação esquemática do experimento para determinação cinética de degradação de hormônios.	75
Figura 3.2 – Representação esquemática das etapas de operação do reator de enriquecimento.	78
Figura 3.3 – Procedimento para seleção de microrganismos utilizando as culturas obtidas no reator de enriquecimento.	79
Figura 3.4 – Representação esquemática do sistema piloto de biorreator a membrana (MBR).....	80
Figura 3.5 – Representação esquemática do sistema piloto de lodos ativados (LA).....	84
Figura 3.6 – Condições operacionais dos reatores: biorreator a membrana (MBR) e lodos ativados (LA).....	84
Figura 3.7 – Representação esquemática do procedimento para a obtenção da TOC por bactérias autotróficas (oxidação de amônia) e heterotróficas.	87
Figura 3.8 – Representação esquemática do procedimento para a obtenção da TOC por bactérias autotróficas (oxidação de nitrito).88	
Figura 3.9 – Representação esquemática do procedimento de extração em fase sólida (SPE).	90
Figura 3.10 – Representação esquemática do procedimento para caracterização da diversidade da comunidade bacteriana.	92
Figura 4.1 – Cromatogramas (a) corrida individual de soluções contendo apenas um dos compostos (b) injeção em triplicata de uma amostra com E1, E2 e EE2.	97
Figura 4.2 – Curvas analíticas referente a determinação cromatográfica dos compostos 17 β -estradiol-E2, 17 α -etinilestradiol-EE2 e estrona-E1 (n=3).	99

Figura 4.3 – Cromatograma referente os pontos da curva analítica.	100
Figura 4.4 – Remoção de estrogênios com (a) lodo ativado e (b) lodo inativado (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP). Inserção: concentração de estrogênio após 24 h.	105
Figura 4.5 – Degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 em diferentes concentrações de SSV (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP), (d) Cromatograma da amostra com 2000 mg/L de SSV.	107
Figura 4.6 – Degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 em diferentes meios aquosos (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP) (d) Cromatograma da amostra sobrenadante.	110
Figura 4.7 – Degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 em diferentes concentrações de metanol (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP) (d) Cromatograma da amostra com 197,5 mg/L de metanol.	113
Figura 4.8 – Perfil de degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 com lodo ativado proveniente de diferentes sistemas de tratamento (ETE1; ETE2; ETE3) (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP) (d) Cromatograma da ETE3.	115
Figura 4.9 – Perfil de bandas do gel de DGGE da comunidade microbiana. Os números representam os ensaios da Tabela 3.3. Os ensaios 03 e 05 foram realizados com a mesma amostra de lodo, portanto são iguais.	118
Figura 4.10 – Concentração dos hormônios EE2, E2 e E1, presente no efluente do reator de enriquecimento ao longo do tempo*.	121
Figura 4.11 – Perfil de bandas do gel de DGGE da comunidade microbiana presente no reator de enriquecimento.	123
Figura 4.12 – Perfil de degradação de hormônios com a amostra retirada do reator e cultivada.	125
Figura 4.13 – Cromatogramas referentes a detecção de hormônios após o estudo de degradação com as culturas isoladas.	127
Figura 4.14 – Valores referentes a concentração e eficiência de remoção de DQO verificados na entrada e na saída do reator.	129
Figura 4.15 – Valores referentes a concentração e eficiência de remoção de amônia verificados na entrada e na saída do reator.	130
Figura 4.16 – Valores referentes a concentração e eficiência de remoção de hormônios (a) E2, (b) E1 e (c) EE2 verificados na entrada e na saída do reator.	132

Figura 4.17 – Valores de concentração de SST e SSV e relação SSV/SST, encontrados nos reatores LA e MBR ao longo do tempo*.....	135
Figura 4.18 - Cargas volumétricas aplicadas, orgânica (COV) e nitrogenada (CNV) (a), e relação alimento/microorganismo (A/M) (b).....	137
Figura 4.19 – Valores de oxigênio dissolvido e temperatura, encontrados nos reatores LA e MBR ao longo do tempo.	138
Figura 4.20 – Valores de pH obtidos em todos os pontos de coleta dos reatores LA e MBR ao longo do período operacional.....	139
Figura 4.21 – Valores de granulometria obtidos a partir das amostras de lodo dos reatores LA e MBR.....	140
Figura 4.22 – Valores de pressão transmembrana obtidos durante o período de operação do reator MBR.	141
Figura 4.23 – Microrganismos identificados nas amostras de lodo dos reatores LA e MBR. O aumento é indicado entre parênteses.....	143
Figura 4.24 – Perfil de bandas do gel de DGGE da comunidade microbiana presente nos reatores LA e MBR (a) três primeiros meses e (b) último mês de monitoramento. Os números se referem ao dia de coleta da amostra no reator.	146
Figura 4.25 – Semelhança entre a comunidade bacteriana presente nos reatores LA e MBR ao longo do período operacional.....	148
Figura 4.26 – Valores de turbidez encontrados na saída dos reatores LA e MBR e eficiência de remoção.	150
Figura 4.27 – Valores de concentração e eficiência de remoção de DQO encontrados nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.....	151
Figura 4.28 – Valores de concentração e eficiência de remoção de amônia nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.....	153
Figura 4.29 – Valores de concentração de nitrito (a, b) e nitrato (c, d) nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA (a, c) e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR (b, d).....	154
Figura 4.30 – Valores de concentração de fosfato nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA (a) e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR (b).....	157

Figura 4.31 – Valores de concentração e eficiência de remoção de COD nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.....	158
Figura 4.32 – Valores de concentração e eficiência de remoção de E2 nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.....	159
Figura 4.33 – Valores de concentração e eficiência de remoção de E1 nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.....	160
Figura 4.34 – Valores de concentração e eficiência de remoção de EE2 nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.....	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Propriedades químicas dos estrogênios.....	43
Tabela 2.2 - Efeitos e anomalias em peixes atribuídos aos DEs.	46
Tabela 2.3 - Microrganismos identificados como capazes de degradar hormônios e capacidade de degradação em alguns estudos.	55
Tabela 2.4 – Formas de aprimorar a remoção de estrogênios desde a geração até o fim do processo de tratamento de esgoto.	57
Tabela 2.5 - Capacidade de degradação de hormônios utilizando sistemas de lodos ativados.....	62
Tabela 2.6 - Capacidade de degradação de hormônios utilizando sistemas aeróbio de biorreator a membrana.	67
Tabela 3.1 – Composição do meio sintético e da solução de elementos traço.....	73
Tabela 3.2 – Composição das soluções de esgoto sintético.	73
Tabela 3.3 – Condições experimentais para degradação aeróbia de hormônios.....	76
Tabela 3.4 – Condições de operação do reator de enriquecimento.	77
Tabela 3.5 – Descrição do piloto e parâmetros operacionais adotados.	81
Tabela 3.6 – Características do módulo de membrana.....	82
Tabela 3.7 – Parâmetros monitorados em seis pontos de coleta dos reatores.	85
Tabela 3.8 – Análises, métodos analíticos e equipamentos utilizados para a caracterização das amostras.....	86
Tabela 3.9 – Reagentes necessários para a execução da técnica de PCR.	93
Tabela 3.10 – Condições para a corrida do gel de DGGE.....	94
Tabela 4.1 - Parâmetros de validação do método utilizado para analisar os estrogênios em diferentes concentrações de trabalho.	98
Tabela 4.2 – Valores dos limites de quantificação do método*.	98
Tabela 4.3 – Valores médios de exatidão e precisão.....	99
Tabela 4.4 – Parâmetros de adsorção para calcular a concentração de estrogênio no lodo inativado.	103
Tabela 4.5 – Valores da taxa de consumo de oxigênio para as bactérias presentes nos reatores em mgO ₂ /gSSV.h.	145
Tabela 4.6 – Eficiência média e desvio padrão de remoção dos estrogênios em diferentes períodos de operação dos reatores*... ..	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/M	Alimento/microrganismo
AMO	Ammonia monooxygenase (amônia monooxygenase)
AOB	Ammonia-oxidizing bacteria (bactérias oxidadoras de amônia)
ACN	Acetonitrila
ATU	Alitiouréia
CAS	Conventional activated sludge (lodo ativado convencional)
CH ₃ OH	Metanol
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COD	Carbono orgânico dissolvido
COT	Carbono orgânico total
COV	Carga orgânica volumétrica
CNV	Carga nitrogenada volumétrica
DAD	Detetores de arranjo de diodos
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DEs	Desreguladores endócrinos
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos trifosfatos
DP	Desvio padrão
DQO	Demanda química de oxigênio
E1	Estrona
E2	17β-estradiol
E3	Estriol
EDC	Endocrine disrupting compounds (disruptores endócrinos)
EE2	17α-etinilestradiol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Entrada	Amostra de esgoto sintético
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FLC	Faixa linear de concentração
FLU	Detector de fluorescência
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
H ₂ O	Água

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
K_{bio}	Constante de biodegradação do composto
K_{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
K_{oc}	Coefficiente de adsorção normalizado em função do conteúdo orgânico
LA	Lodo ativado
LAN	Lodo ativado nitrificante
LA 4L	Amostra retirada do interior do reator LA, 5 min após o enchimento, volume máximo de 4 L
LaRA	Laboratório de Reúso de Águas
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LIMA	Laboratório Integrado do Meio Ambiente
LOAEL	Lowest observed adverse effect level
MBR	Membrane bioreactor (Biorreator a membrana)
MBR 5L	Amostra retirada do interior do reator MBR, 5 min após o enchimento, volume máximo de 5 L
MBR 4L	Amostra retirada do interior do reator MBR após 3 h de reação, volume mínimo de 4 L.
N-NH_4^+	Amônia
N-NO_2^-	Nitrito
N-NO_3^-	Nitrato
NOAEL	No observed adverse effect level
O_2	Oxigênio
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
P-PO_4^{3-}	Fosfato
PTM	Pressão transmembrana
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
Saída MBR	Permeado ao reator MBR
Saída LA	Sobrenadante ao reator LA
SBR	Sequencing batch reactor (reator em batelada sequencial)

SPE	Extração em fase sólida
SRD	Desvio padrão relativo
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket (reator anaeróbio de manta de lodo)
UE	União européia
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VTG	Vitelogenina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	OBJETIVOS.....	34
1.1.1	<i>Objetivo geral</i>	<i>34</i>
1.1.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>34</i>
1.2	HIPÓTESES.....	34
1.3	JUSTIFICATIVA	35
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	39
2.1	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	40
2.2	ESTROGÊNIOS NATURAIS E SINTÉTICOS.....	42
2.2.1	<i>Efeitos dos estrogênios</i>	<i>45</i>
2.3	PROCESSOS ENVOLVIDOS NA REMOÇÃO DOS ESTROGÊNIOS	46
2.3.1	<i>Processo de sorção.....</i>	<i>48</i>
2.3.2	<i>Processo de biodegradação</i>	<i>49</i>
2.3.2.1	Cultivo de microrganismos.....	52
2.4	PROCESSOS DE REMOÇÃO DE ESTROGÊNIO DO ESGOTO	56
2.4.1	<i>Sistemas de lodos ativados (LA).....</i>	<i>58</i>
2.4.1.1	Remoção de estrogênios nos sistemas LAs	59
2.4.2	<i>Biorreatores à membrana (MBR).....</i>	<i>63</i>
2.4.2.1	Remoção de estrogênios nos sistemas MBRs	64
3	MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1	MATERIAIS	70
3.1.1	<i>Compostos de estudo (hormônios)</i>	<i>70</i>
3.1.2	<i>Inóculo (lodo).....</i>	<i>71</i>
3.1.3	<i>Meio e esgoto sintético.....</i>	<i>72</i>
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	74
3.2.1	<i>Primeira etapa – Cinética de remoção de hormônios em diferentes condições experimentais.....</i>	<i>74</i>
3.2.2	<i>Segunda etapa – Cultivo de microrganismos.....</i>	<i>76</i>
3.2.2.1	Cultivo de microrganismos em reator de enriquecimento	76
3.2.2.2	Seleção de grupos de microrganismos.....	78
3.2.3	<i>Terceira etapa – Avaliação preliminar do biorreator a membranas na degradação de hormônios.....</i>	<i>80</i>

3.2.4	<i>Quarta etapa – Operação dos sistemas de biorreator a membrana e lodos ativados.....</i>	<i>82</i>
3.3	TÉCNICAS DE ANÁLISE.....	86
3.3.1	<i>Caracterização físico-química</i>	<i>86</i>
3.3.2	<i>Caracterização do lodo</i>	<i>86</i>
3.3.3	<i>Determinação de hormônios.....</i>	<i>88</i>
3.3.3.1	Procedimento de extração em fase sólida.....	88
3.3.3.2	Condições cromatográficas experimentais.....	90
3.3.3.3	Validação cromatográfica	90
3.3.4	<i>Análises moleculares.....</i>	<i>91</i>
3.3.4.1	Extração do DNA.....	92
3.3.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	93
3.3.4.3	Eletofórese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	94
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	96
4.2	ENSAIOS CINÉTICOS DE REMOÇÃO DE HORMÔNIOS (PRIMEIRA ETAPA)	101
4.2.1	<i>Estudo dos fatores que afetam a remoção dos estrogênios</i>	<i>101</i>
4.2.1.1	Efeito do tipo de lodo (ativado e inativado)	102
4.2.1.2	Impacto do conteúdo de sólidos suspensos voláteis... ..	106
4.2.1.3	Influência das características do meio aquoso utilizado	109
4.2.1.4	Influência da concentração de metanol	112
4.2.1.5	Efeito da origem do lodo	114
4.2.2	<i>Diversidade bacteriana do lodo</i>	<i>117</i>
4.3	CULTIVO DE MICRORGANISMOS (SEGUNDA ETAPA).....	119
4.3.1	<i>Cultivo em reator de enriquecimento</i>	<i>119</i>
4.3.2	<i>Cultivo e seleção dos microrganismos em frações... ..</i>	<i>124</i>
4.4	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO BIORREATOR A MEMBRANAS NA DEGRADAÇÃO DOS HORMÔNIOS (TERCEIRA ETAPA)	128
4.4.1	<i>Avaliação do comportamento do sistema em relação às variáveis físico-químicas.....</i>	<i>128</i>
4.4.2	<i>Avaliação do comportamento do sistema em relação a eficiência de remoção de hormônios</i>	<i>131</i>
4.5	AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE BIORREATOR À MEMBRANA E LODOS ATIVADOS (QUARTA ETAPA).....	134

4.5.1	<i>Condições operacionais</i>	134
4.5.1.1	Microscopia	142
4.5.1.2	Respirometria	144
4.5.1.3	Comunidade bacteriana	145
4.5.2	<i>Eficiência de remoção</i>	149
4.5.2.1	Eficiência de remoção das variáveis físico-químicas	149
4.5.2.2	Eficiência de remoção de hormônios	158
4.6	CONSIDERAÇÕES RELACIONADAS A EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE HORMÔNIOS NOS REATORES LA E MBR	164
5	CONCLUSÕES	169
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	173
6	REFERÊNCIAS	175

1 INTRODUÇÃO

“Só um sentido de invenção e uma necessidade intensa de criar levam o homem a revoltar-se, a descobrir e a descobrir-se com lucidez”.

Pablo Picasso

A água, um bem necessário para o desenvolvimento e manutenção da vida de quase todas as espécies existentes no planeta Terra, vem sendo motivo de preocupação em relação a sua quantidade e, principalmente, sua qualidade. Embora as fontes hídricas sejam abundantes, elas são distribuídas de forma heterogênea e muitas vezes contaminadas pelo lançamento direto e indireto de esgotos, tornando este recurso cada vez mais escasso. Até mesmo o lançamento de efluentes gerados em estações de tratamento de esgoto, pode contaminar o corpo receptor, devido à presença de poluentes que não foram devidamente removidos.

Um dos campos mais proeminentes da química ambiental é justamente o estudo dos micropoluentes em ambientes aquáticos. Dentre eles estão os desreguladores endócrinos, produtos químicos com potencial para provocar efeitos maléficos sobre os sistemas endócrinos dos seres humanos e animais, mesmo em pequenas concentrações (ng/L) (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

A preocupação em relação a presença destes contaminantes está diretamente relacionada aos efeitos provocados, como, distúrbios na saúde reprodutiva de organismos em geral, contribuindo para o desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, testicular e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, endometriose, redução de fertilidade masculina, alteração de glândulas tireoides, supressão de imunidade e efeitos neurocomportamentais (FOLMAR et al., 2000; CASTRO, 2002; FALONE, 2007).

Fazem parte do grupo dos desreguladores endócrinos os estrogênios naturalmente produzidos pelo corpo humano, e ingeridos, na forma de medicamentos para fins terapêuticos e contraceptivos. Estas substâncias não são totalmente absorvidas pelo organismo, e são excretadas pela urina e pelas fezes, chegando assim, aos sistemas de tratamento de esgoto. Entretanto, os sistemas convencionais de tratamento de esgoto não são adequadamente projetados para eliminar esses compostos e, portanto, evitar que estes sejam lançados nos corpos d'água receptores.

Além da vasta gama de trabalhos desenvolvidos a nível internacional, muitas pesquisas já foram conduzidas no Brasil com o intuito de avaliar diferentes abordagens relacionadas aos desreguladores endócrinos. Alguns trabalhos visaram à preparação de amostras e a

determinação analítica da concentração destes compostos em diferentes meios, por técnicas cromatográficas (VERBINNEN; NUNES; VIEIRA, 2010; MONTAGNER; JARDIM, 2011; MOREIRA et al., 2011; LIZ; NAGATA; ZAMORA, 2012; PESSOA et al., 2012; QUEIROZ et al., 2014). Outros verificaram a ocorrência dos desreguladores endócrinos no ambiente aquático (TERNES et al., 1999; KUSTER et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; LOPES et al., 2010; SODRÉ et al., 2010; MONTAGNER; JARDIM, 2011; MOREIRA et al., 2011) e quantificaram a eficiência de remoção de sistemas de tratamento de esgotos (QUEIROZ et al., 2012; BRANDT et al., 2013; PESSOA et al., 2014). Por fim, estudos foram conduzidos para avaliar formas de remoção e degradação destes micropoluentes (DURIGAN et al., 2012; MARINHO et al., 2013; LIMA et al., 2014a; LIMA et al., 2014b).

A partir dos estudos realizados, observa-se que os estrogênios de maior relevância para o meio ambiente são os hormônios naturais, 17β -estradiol (E2) e estrona (E1), e o hormônio sintético, 17α -etinilestradiol (EE2). Desta forma, entende-se que o estudo dos principais processos envolvidos na remoção de estrogênios, pode possibilitar a otimização dos sistemas de tratamento de esgoto, através da melhor compreensão dos caminhos percorridos por estes compostos, e do entendimento do mecanismo de ação dos microrganismos atuantes em tais processos.

Os sistemas de tratamento por meio de lodos ativados e mais recentemente os biorreatores a membrana, têm sido utilizados como alternativa para tratar esgoto sanitário. Estes sistemas são caracterizados como tecnologias eficientes na remoção de material orgânico de efluentes líquidos. A operação destes sistemas na forma de batelada sequencial tem sido estudada para atender a demanda de pequenas comunidades, como um sistema de tratamento descentralizado, e para avaliar a eficiência de remoção de nutrientes como as formas nitrogenadas e fosfatadas.

Segundo Lesjean et al. (2011), a tecnologia de biorreator a membrana não é mais eficiente do que os sistemas convencionais de lodos ativados, projetados para realizar os processos de nitrificação e desnitrificação, na remoção de micropoluentes orgânicos, quando condições operacionais semelhantes (temperatura, carga, processo, tempo de retenção de sólidos) são utilizadas. Desta forma, no presente

trabalho sistemas piloto de biorreator a membrana e lodos ativados foram operados em batelada sequencial e comparados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a remoção simultânea dos hormônios estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em condições aeróbias.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar como variações nas condições operacionais do tratamento aeróbio (concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) e da fonte de carbono, características do meio, origem e forma do lodo), em escala de bancada, influenciam na degradação dos hormônios (E1, E2 e EE2);
- Avaliar a biodegradação dos hormônios pela microbiota, a partir de condições controladas, em um reator de enriquecimento;
- Comparar dois sistemas piloto de tratamento de esgoto, lodos ativados (LA) e biorreator a membrana (MBR) operados em batelada sequencial, quanto à eficiência de remoção de hormônios e das variáveis físico-químicas, e quanto à diversidade da comunidade bacteriana.

1.2 HIPÓTESES

- A eficiência na degradação de hormônios pode diferir em função de diferentes condições operacionais introduzidas em um sistema de tratamento;
- Em reatores biológicos a presença de hormônios, como principal fonte de carbono externa, irá possibilitar o desenvolvimento de microrganismos específicos, capazes de realizar a degradação destes compostos;
- O biorreator a membrana (microfiltração) é capaz de promover a retenção e o desenvolvimento de bactérias degradadoras de hormônios com maior eficiência do que o sistema de lodos ativados.

1.3 JUSTIFICATIVA

A presença de hormônios em águas superficiais é uma preocupação crescente com relação à saúde da população, e remete ao entendimento de que os sistemas de tratamento de esgoto não seriam efetivos na remoção destes micropoluentes. Por essa razão, mais estudos se fazem necessários do ponto de vista da compreensão da dinâmica dos sistemas de tratamento e, considerando-se um sistema biológico, como os microrganismos atuam na degradação de hormônios.

Neste sentido, o entendimento do processo de biodegradação aliado à aplicação de tecnologias inovadoras como os biorreatores a membrana, pode promover o aumento na eficiência de remoção de hormônios, melhoramento na qualidade do efluente e na manutenção da qualidade ambiental de corpos receptores.

A utilização da tecnologia de membranas vem sendo estudada no Laboratório de Reúso de Águas (LaRA), da Universidade Federal de Santa Catarina, em trabalhos relacionados ao tratamento de água de abastecimento (CORAL, 2009; CORAL et al., 2011; AMARAL et al., 2012) e esgoto sanitário (LAPOLLI, 1998; ANDRADE, 2001; PELEGRIN, 2004; PROVENZI, 2005; MAESTRI, 2007; CAMPELLO, 2009; BELLI, 2011; KELLNER, 2014).

A utilização da tecnologia de MBR para tratamento de esgoto iniciou-se com o trabalho de Provenzi (2005) utilizando um MBR para avaliar o desempenho hidrodinâmico e físico-químico no controle da colmatção. No estudo desenvolvido por Maestri (2007), a utilização do MBR como alternativa para o tratamento de esgotos sanitários e reúso da água foi avaliada e, Campello (2009) utilizou um MBR, com o objetivo de avaliar a eficiência de remoção da carga orgânica e de nutrientes, e verificar o potencial de reúso do efluente tratado.

Belli et al. (2012; 2014a; 2014b) monitoraram um sistema piloto de MBR, operado em batelada sequencial, para avaliar a remoção de nutrientes. Kellner (2014) estudou a remoção de nutrientes em um MBR híbrido de leito móvel. Observa-se que, no início a tecnologia era aplicada para pós-tratamento, passando por estudos hidrodinâmicos dos reatores e, os últimos trabalhos já visualizaram a remoção de contaminantes específicos.

De acordo com o exposto, observa-se que a utilização de um MBR na remoção de hormônios do esgoto contribuiu para o aprofundamento dos estudos realizados no LaRA. Além disso, colabora com o desenvolvimento da pesquisa relacionada ao tema na UFSC.

Os hormônios estão inseridos em um grupo de compostos, denominado de desreguladores endócrinos, responsáveis por provocar diversos efeitos deletérios aos sistemas em que são inseridos, entretanto, não estão disponíveis legislações relacionadas a presença de tais substâncias em ambientes aquáticos. Em 2012 foi publicado um documento (UNEP-WHO, 2012) sobre desreguladores endócrinos, elaborado pelo Programa de Meio Ambiente das Nações Unidas (United Nations Environment Programme - UNEP) e pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO), em colaboração com especialistas internacionais. Este documento fornece o status global do conhecimento científico sobre exposição e efeitos destas substâncias na saúde humana e de espécies selvagens, bem como as principais preocupações relacionadas.

Desta forma, observa-se que os estudos e constatações que justificam o estabelecimento de padrões de lançamento de efluentes, níveis em corpos receptores ou até mesmo quantidade mínima em água potável, não foram ainda completamente consolidados. Segundo Hecker e Hollert (2011), muitos esforços têm se concentrado na avaliação de riscos químicos, no entanto, pouco tem sido discutido a respeito das avaliações de riscos ambientais com relação aos micropoluentes.

Alguns países elaboraram documentos que são utilizados como guias, entretanto, as recomendações não são legisladas. O documento Australian Guidelines for Water Recycling, elaborado por dois conselhos Australianos sugere diretrizes para a água potável, com relação à máxima concentração aceitável de diversos compostos químicos. Os valores recomendados para os compostos de interesse deste estudo são 175, 1,5 e 30 ng/L para E2, EE2 e E1, respectivamente (AUSTRALIAN, 2008). A Comunidade Europeia sugere um padrão de qualidade ambiental (Environmental Quality Standards - EQS) para diversos compostos. Os valores médios anuais sugeridos para águas superficiais, como rios, lagos e corpos d'água modificados, são de 0,035 ng/L para EE2 e 0,4 ng/L para E2 (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

Os valores de referência são baseados em dois conceitos LOAEL (Lowest-observed-adverse-effect level) e NOAEL (No-observed-adverse-effect level). LOAEL representa o nível mais baixo de exposição em que há aumentos biologicamente significativos na frequência ou gravidade dos efeitos adversos entre a população exposta e seu grupo de controle apropriado. NOAEL é referente ao mais alto nível de exposição em que não há aumentos biologicamente significativos na frequência ou gravidade dos efeitos adversos entre a população exposta e seu controle apropriado; alguns efeitos podem ser produzidos a este nível, mas eles não são considerados adversos ou precursores de efeitos adversos (EPA).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Diversos pesquisadores estão investigando um grupo específico de compostos químicos presentes no meio ambiente, responsáveis por causar perturbações no sistema endócrino hormonal de organismos humanos e animais: são os chamados desreguladores endócrinos, do inglês *endocrine disrupting compounds* (EDC). Estes compostos agem inibindo ou alterando as funções regulares normais dos sistemas imunológico, nervoso e endócrino (TERNES, KRECKEL e MUELLER, 1999; TERNES et al., 1999; CASTRO, 2002; CLARA et al., 2005; CHANG et al., 2006; HU et al., 2007; LEE et al., 2008; MOREIRA et al., 2009; CASES et al., 2011; ZHOU et al., 2012).

Os trabalhos desenvolvidos no Brasil costumam adotar diferentes terminologias para estes compostos, como por exemplo: perturbadores endócrinos (CASTRO, 2002; BILA; DEZOTTI, 2003); interferentes endócrinos (GHISELLI; JARDIM, 2007; SODRÉ et al., 2007; SILVA; COLLINS, 2011); disruptores endócrinos (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006); e desreguladores endócrinos (BILA; DEZOTTI, 2007; MORAES et al., 2008; LIMA et al., 2014a). Neste trabalho adotou-se o termo “desreguladores endócrinos” (DEs).

Estes compostos são excretados pelo organismo humano e desta forma são comumente encontrados no esgoto doméstico, e não são completamente removidos durante o processo convencional de tratamento de efluentes (WINTGENS; GALLENKEMPER; MELIN, 2002; COLEMAN et al., 2009).

Várias organizações classificam diferentes substâncias como desreguladores endócrinos, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), a União Europeia (UE), a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), entre outras. Na listagem estabelecida pela UE constam mais de quinhentos compostos e a tendência é o aumento deste número, devido às diversas pesquisas em andamento. Outra questão relevante é a diferença entre os compostos, relacionadas à forma e ao mecanismo de ação (BOLONG et al., 2009).

Outro problema de grande importância relacionado aos DEs é a identificação e avaliação em matrizes ambientais, promovendo dificuldades relacionadas à detecção e quantificação dos compostos, sendo que os principais problemas estão relacionados: a baixa concentração ($\mu\text{g/L}$ ou ng/L); aos compostos apresentarem uma ampla variedade de características físico-químicas, portanto cada composto requer uma análise específica por diferentes técnicas; serem necessárias

tecnologias analíticas capazes de detectar um maior número de compostos em níveis de concentração reduzidos; e ser essencial uma metodologia/tecnologia de detecção altamente sensível e seletiva, principalmente para amostras complexas (lodo e efluente) (BOLONG et al., 2009).

Os métodos para determinação da concentração de DES geralmente consistem de uma etapa de pré-tratamento ou extração, seguido por uma análise instrumental que compreende um ambiente específico para cada composto alvo baseado nas suas propriedades químicas. Alguns exemplos podem ser citados: método imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA); cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS); e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (CHANG et al., 2009).

Espectrômetros de massa fornecem informações importantes, tais como a determinação do peso molecular e caracterização estrutural de componentes presentes em uma mistura complexa. Além disso, a espectrometria de massa proporciona maior sensibilidade em virtude do princípio de detecção, maior seletividade através de monitoramento de íons selecionados ou por espectrometria de massa em tandem e melhor resolução, monitorando diferentes massas em diferentes canais (KAMEL; PRAKASH, 2006).

Além dos detectores por espectrometria de massas, os detectores espectrofotométricos são de grande relevância e aplicação em análises de resíduos em matrizes ambientais. Um dos mais adequados é o equipamento com detecção por arranjo de diodos (DAD) que permitem obter um espectro de absorção a cada segundo, gerando informações que possibilitam a confirmação dos compostos. O detector DAD possui alta resolução espectral e em adição a informações qualitativas, a qualidade da análise é aumentada, permitindo checar a identidade do composto e a pureza do pico. Com este detector é possível obter espectros tridimensionais, mostrando absorbância, comprimento de onda e tempo de retenção (CALDAS et al., 2011).

Os compostos classificados como desreguladores endócrinos são divididos em duas classes principais: compostos sintéticos e naturais. Os primeiros são produzidos para uso na agricultura, na medicina e na indústria, como os pesticidas, agentes terapêuticos e farmacêuticos, plastificantes ftalatos, dioxinas, alquilfenóis, bifenilas policloradas, parabenos, organoclorados, compostos orgânicos de estanho, retardantes de chama bromados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos,

plastificante bisfenol, metais pesados, entre outros. Já os compostos naturais incluem os estrogênios naturais produzidos no corpo humano e nos animais e os fitoestrogênios presentes nas plantas (BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007; HU et al., 2007).

Como visto, existe uma extensa e ampla quantidade de substâncias classificadas como DEs, sendo que os compostos de grande relevância no efluente são os estrogênios e outros micropoluentes, tais como fármacos e produtos de higiene pessoal (BOLONG et al., 2009). Portanto os DEs que foram utilizados neste trabalho incluem três estrogênios, sendo eles, dois hormônios naturais femininos, estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2), e um estrogênio sintético usado na medicina como contraceptivo e em algumas terapias hormonais, o 17 α -etinilestradiol (EE2).

2.2 ESTROGÊNIOS NATURAIS E SINTÉTICOS

Os hormônios sexuais femininos, estrona, 17 β -estradiol e estriol, conhecidos como E1, E2 e E3, respectivamente, são os mais importantes estrogênios endógenos. Dos três, o E2 tem a atividade biológica mais alta, a estrona tem um terço desta atividade, e o estriol tem somente 1% da atividade do E2. E2 e E1 são os principais estrogênios em mulheres não grávidas, estando presentes também em homens, porém em menor concentração. O E3 é um produto metabólico de E2 e E1. A concentração de E3 aumenta durante a gravidez, tornando-se o hormônio predominante na mulher e no feto (SUIDAN et al., 2005).

Vários hormônios sexuais naturais e sintéticos são utilizados com objetivos terapêuticos. As quantidades administradas são geralmente altas e, em muitos casos, uma significativa porcentagem não é assimilada pelo organismo, mas sim excretada. O 17 α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético, utilizado como contraceptivo, com dosagem típica diária administrada por mulheres de 20 a 50 μg , em um período de 21 dias. Após a administração, aproximadamente 25% do EE2 conjugado é excretado (SUIDAN et al., 2005).

Em um levantamento realizado por Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000), observa-se que a excreção diária entre homens e mulheres para 17 β -estradiol, estrona e estriol fica em torno de 1 a 8 $\mu\text{g}/\text{dia}$, sendo a excreção realizada pelas mulheres maior do que a realizada pelos homens. O EE2 é excretado na concentração de 35 $\mu\text{g}/\text{d}$ pelas mulheres. Já as mulheres grávidas liberam em torno de 259, 600 e 6000 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, E1 e E3, respectivamente.

A estrutura química dos estrogênios naturais é composta por 18 carbonos com um anel fenólico, que tem uma alta afinidade para se ligar aos receptores de estrogênio, enquanto que a estrutura do 17α -etinilestradiol é similar a dos estrogênios naturais com a substituição do etinil no carbono 17, conforme Figura 2.1. As propriedades químicas dos estrogênios são apresentadas na Tabela 2.1 (ROH, 2009).

Figura 2.1 - Estrutura química da estrona (a), estriol (b), 17β -estradiol (c) e 17α -etinilestradiol (d).

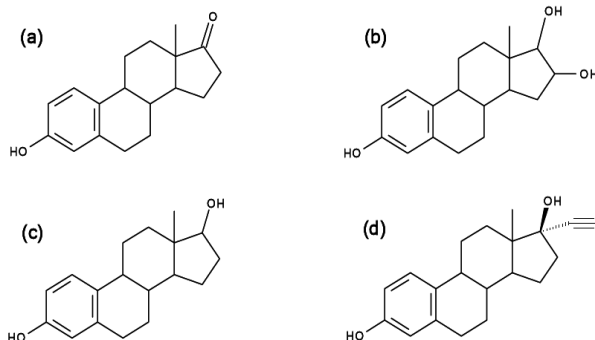


Tabela 2.1 - Propriedades químicas dos estrogênios.

Nome	E1	E2	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)	270,4	272,4	296,4
Ponto de fusão ($^{\circ}C$)	255-262	178-179	-
Solubilidade em água (mg/L)	12,4-13,0	13,0	4,8
Log K_{ow}	3,43	3,94	4,15
K_{bio} (L/gSS.d) ^a	$10 \pm 1 - 430 \pm 55$	$175 \pm 10 - 950 \pm 120$	$1 \pm 0,5 - 8 \pm 2$
Log K_{oc} ^b	3,00 - 4,18	3,13 - 3,69	2,90 - 4,16
Pressão de vapor (mmHg)	$2,3 \times 10^{-10}$	$2,3 \times 10^{-10}$	$4,5 \times 10^{-11}$
Meia-vida (dias) ^c	0,1 - 10,9	0,2 - 8,7	17

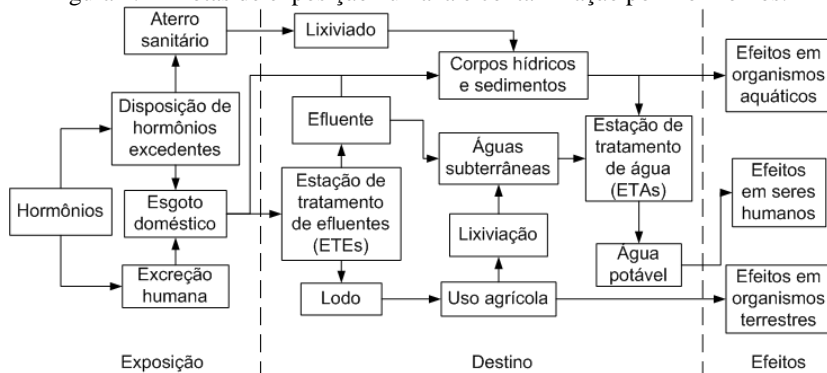
Fonte: Roh (2009). E1 - Estrona; E2 - 17β -Estradiol; EE2 - 17α -etinilestradiol.

a - Joss et al. (2004). b - Carballa et al. (2008). c - valores para 100 μ g/L de E2 a 20 $^{\circ}C$ em água de rio (JURGENS et al., 2002).

Os estrogênios naturais, apesar de possuírem meia-vida relativamente curta (Tabela 2.1) quando comparados a outros compostos orgânicos, como alguns pesticidas, são continuamente introduzidos no ambiente, o que lhes concede um caráter de persistência (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006). Além do lançamento direto de esgoto sem tratamento nos corpos receptores outra fonte importante de estrogênios no ambiente são as ETEs, pois as instalações convencionais não são projetadas para remover DEs e seus subprodutos de degradação (BASILE et al., 2011).

A principal rota de exposição aos estrogênios para homens e animais é através da alimentação, especialmente para espécies que se encontram no topo da cadeia alimentar (BOLONG et al., 2009). Na Figura 2.2 são apresentadas as possíveis rotas percorridas pelos hormônios no meio ambiente.

Figura 2.2 - Rotas de exposição humana e contaminação por hormônios.



Adaptado de: Hirsch et al. (1999); Jorgensen e Halling-Sorensen (2000); Reis Filho, Araújo e Vieira (2006); Aquino, Brandt e Chernicharo (2014).

Segundo Jorgensen e Halling-Sorensen (2000), o caminho percorrido pelos hormônios em um sistema de tratamento de esgoto pode ocorrer de diferentes maneiras: degradação por microrganismos aeróbios para dióxido de carbono e água; dependendo da lipofilicidade o composto pode ser retido no lodo, caso este lodo seja aplicado no solo pode provocar a contaminação de áreas agrícolas. Além disso, os compostos são móveis no solo e podem alcançar águas subterrâneas ou córregos, dependendo da capacidade de ligação dos compostos, tanto organismos aquáticos como terrestres estarão expostos à contaminação;

os compostos persistentes, que não se ligam ao lodo, não são retidos e nem degradados e, portanto, atingem facilmente os corpos receptores podendo provocar efeitos nos organismos presentes neste ambiente.

2.2.1 Efeitos dos estrogênios

O hormônio E1 foi identificado como o estrogênio natural mais importante com relação aos efeitos provocados ao ambiente. Apesar de E1 apresentar um potencial de agir como interferente endócrino menor em relação ao E2, as concentrações típicas encontradas no efluente são maiores, provavelmente por ser um dos metabólitos naturais de E2. Já a presença do estriol no ambiente é menos preocupante, pois o mesmo é, em geral, lançado em baixas concentrações e apresenta um potencial de interferente endócrino relativamente baixo em comparação a outros hormônios (JOHNSON; SUMPTER, 2001; COLEMAN et al., 2009).

Com base em teste *in vitro* de potência e concentração estrogênica, E1 seria o interferente endócrino mais importante e EE2 não seria identificado como um composto passível de preocupação. Entretanto, em termos de meio ambiente, um peso maior deve ser dado para o potencial *in vivo*, assumindo os compostos que realmente são detectados no efluente. Sendo assim, EE2 é, sem dúvida, um estrogênio extremamente potente (JOHNSON; SUMPTER, 2001).

Os hormônios são compostos muito ativos. Assim, uma contínua exposição, mesmo em baixas concentrações, pode ter mais de um efeito no sistema endócrino imaturo, e produzir graves consequências (BASILE et al., 2011). Investigações *in vivo* mostraram que exposição de peixes a concentrações de 1 ng/L de E2 ou 0,1 ng/L de EE2 provocaram feminização de algumas espécies (ZUEHLKE et al., 2006).

Em revisões realizadas por Bila e Dezotti (2003; 2007) foram apresentados vários trabalhos relacionados ao efeito de substâncias com atividade estrogênica, no desenvolvimento de anomalias no sistema reprodutivo de peixes. Essas anomalias têm sido atribuídas à presença de substâncias estrogênicas em ambientes aquáticos, e são associadas ao descarte de efluentes de ETEs em corpos receptores. Quanto maior o potencial estrogênico, maior a capacidade da substância em provocar efeitos adversos em homens e animais. Na Tabela 2.2 podem ser observados os efeitos causados em peixes em contato com estrogênios.

Tabela 2.2 - Efeitos e anomalias em peixes atribuídos aos DEs.

Contaminante	Efeitos
17 β -estradiol	Feminização de peixes Alteração nas gônadas Hermafroditismo Incidência de testículo-óvulos nas gônadas Declínio na reprodução Inibição do crescimento testicular Mortalidade elevada dos descendentes Indução da síntese de vitelogenina (VTG)
Estrona	Indução da síntese de VTG Inibição do crescimento testicular
17 α -etinilestradiol	Indução da síntese de VTG Mortalidade da espécie Declínio na reprodução

Fonte: Bila e Dezotti (2007).

2.3 PROCESSOS ENVOLVIDOS NA REMOÇÃO DOS ESTROGÊNIOS

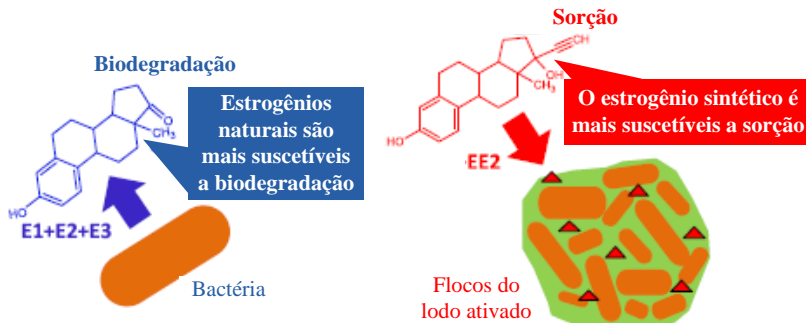
Segundo Liu, Kanjo e Mizutami (2009), os processos envolvidos na remoção de estrogênios são divididos em três categorias: remoção física, biodegradação e processos químicos. Sendo o foco deste trabalho o estudo do comportamento e da remoção dos estrogênios em sistemas biológicos de tratamento de esgoto, os dois primeiros métodos são abordados nesta revisão. Na Figura 2.3 são apresentados os processos de biodegradação e sorção dos hormônios nas partículas do lodo.

A biodegradação é um dos principais processos envolvidos na eliminação dos hormônios em ETEs, mas a sorção também influencia a biodisponibilidade e remoção dos estrogênios. Outros parâmetros tais como tempo de retenção de sólidos (TRS), tempo de detenção hidráulica (TDH) e a presença das etapas de nitrificação e desnitrificação, têm sido identificados como fatores que interferem na degradação de estrogênios em ETEs (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

Os hormônios, quando liberados pelos seres humanos e lançados no esgoto, estão na forma conjugada, menos ativa. O processo de conversão para a forma ativa ocorre no percurso do esgoto entre a residência e a estação de tratamento de esgoto (ETE), ou dentro da ETE durante o tratamento. Esta conversão pode ocorrer pelo contato com a elevada população de *Escherichia coli* no esgoto e, portanto, a rede

coletora e as ETEs podem ser consideradas reatores que convertem estrogênios da forma inativa (conjugada) para a forma ativa (livre) (D'ASCENZO et al., 2003; LOPES et al., 2008).

Figura 2.3 – Principais processos envolvidos na remoção dos estrogênios.



Adaptado de Petrie et al. (2014).

Portanto, a preocupação em uma ETE com relação à presença e a remoção de estrogênios deve considerar, também, a ocorrência de seus conjugados, pois nem todos são transformados antes de entrar na ETE, e podem ser convertidos em estrogênio livre após lançamento nos corpos receptores (HU et al., 2007; KOH et al., 2008).

Além disso, alguns hormônios estão em equilíbrio entre si, tais como o 17β -estradiol (forma reduzida) e a estrona (forma oxidada). Este fato deve ser considerado, pois durante os processos de tratamento, pode haver a conversão de um estrogênio em outro, em função das condições oxidantes e redutoras do meio (LOPES et al., 2008).

Em alguns casos, a concentração de E1 no efluente da ETE pode ser maior do que no afluente. Isto pode ser explicado pela biotransformação de E2 para E1 no processo de tratamento biológico, sendo que a conversão de E2 para E1 ocorre de forma mais rápida em condições aeróbias do que em condições anóxicas, conforme observado por Yang (2009). E2 é encontrado em baixas concentrações no efluente de plantas de tratamento de esgoto, e EE2 e E1 podem ser encontrados de forma mais persistente (KOH et al., 2008).

2.3.1 Processo de sorção

O lodo de esgoto é uma mistura complexa de gorduras, proteínas, aminoácidos, açúcares, carboidratos, lignina, celulose, material húmico e ácidos graxos. No lodo secundário, uma grande quantidade de microrganismos vivos e mortos promove uma área superficial (0,8 a 1,7 m²/g) que aliada a hidrofobicidade dos compostos facilita o processo de sorção. Os DEs adsorvem preferencialmente nestas partículas suspensas devido às suas propriedades hidrofóbicas (BIRKETT; LESTER, 2003).

O TRS pode afetar a natureza física dos flocos e sua capacidade de atuarem como sorventes. As propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas dos flocos dependem em grande parte de sua constituição, que por sua vez é dependente da população bacteriana e de suas taxas de crescimento. Os revestimentos de exopolímeros, formados basicamente por polissacarídeos e proteínas, em torno dos flocos teriam um efeito importante sobre a sua afinidade como adsorventes para compostos como E2 (KOH et al., 2008).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é a relação da concentração em equilíbrio de um composto orgânico entre um líquido orgânico e a água. Este coeficiente é uma das propriedades físicas quantitativas que se correlaciona melhor com a atividade biológica, podendo ser usado como uma medida de lipofilicidade e para prever a sorção no sólido presente em ETEs. O valor do log K_{ow} aumenta com o aumento da lipofilicidade e está inversamente correlacionado com a solubilidade. Altos valores de log K_{ow} são característicos de grandes moléculas hidrofóbicas, as quais tendem a se associar com a matéria orgânica sólida, enquanto que moléculas menores hidrofílicas têm baixo log K_{ow} . Um valor de log K_{ow} menor do que 2,5 demonstra um baixo potencial de sorção, e um log K_{ow} maior do que 4 mostra um alto potencial de sorção em matéria orgânica (BIRKETT; LESTER, 2003).

O conteúdo de carbono orgânico da fase sólida e a significância da polaridade e composição da matéria orgânica têm sido apontados como as principais variáveis de superfície que influenciam a sorção para a maioria dos compostos orgânicos (BIRKETT; LESTER, 2003).

Xu, Harper e Zhao (2008) e Ren et al. (2007a) observaram que a sorção de EE2 envolve a sorção física, como mecanismo dominante, em combinação com um relativamente baixo nível de reação química. Portanto, o composto pode ser desorvido do lodo para o efluente

(processo reversível). Todavia, os autores observaram que o processo de desorção foi muito mais lento do que o processo de adsorção.

Os resultados obtidos por Xu, Harper e Zhao (2008) mostram que o processo de adsorção do composto EE2 é espontâneo ($\Delta G < 0$). Além disso, os autores sugerem que estes resultados podem ser diretamente aplicados em sistemas de tratamento de esgoto em larga escala, pois a concentração encontrada no esgoto bruto é muito menor do que aquela utilizada em seus estudos.

Clouzot (2009) avaliou a adsorção e a biodegradação do EE2 em um sistema descontínuo, utilizando frascos âmbar de 2,5 L aerados contendo lodo (3000 mg/L de sólidos suspensos voláteis (SSV)) e 1000 ou 500 $\mu\text{g/L}$ de EE2, durante 24 h. Em dois frascos foi avaliada a degradação total dos hormônios, e em outros dois frascos, a adsorção dos hormônios no lodo ativado, observada através da adição de um inibidor da atividade biológica (azida). Um conjunto de frascos contendo apenas água e EE2 foi utilizado como controle do processo. Amostras foram coletadas (volume entre 50 e 500 mL) nos tempos de contato de 10 min, 1, 2, 3, 6,5, 12 e 24 h. Uma diminuição de mais de 80% da concentração inicial de EE2 foi observada nos primeiros dez minutos de experimento, para ambos os testes, mostrando a predominância do processo de sorção.

2.3.2 Processo de biodegradação

A degradação de estrogênios ocorre pela oxidação biológica em sistemas de tratamento de esgoto. Fatores químicos, como propriedades estruturais e ambientais, interferem no processo de biodegradação. Geralmente, moléculas com cadeias de hidrocarbonetos muito ramificadas são menos passíveis à biodegradação do que cadeias não ramificadas, e cadeias mais curtas não são tão rapidamente degradadas como cadeias mais longas. Determinados substituintes em um composto irão torná-lo resistente à degradação, como: grupos halogênios ou substituição na posição meta em um anel benzênico; sulfonatos; grupos metoxi; e grupos nitro (BIRKETT; LESTER, 2003).

Um alto TDH em ETEs permite maior tempo para a degradação. O TRS em que a biodegradação máxima ocorre é uma função de $\log K_{ow}$ e da taxa de biotransformação do composto. Portanto, TRSs longos são necessários para compostos muito hidrofóbicos (BIRKETT; LESTER, 2003).

A preferência dos microrganismos é degradar fontes de carbono facilmente assimiláveis ao invés dos estrogênios. Quando a carga de lodo é baixa, em termos de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), os microrganismos são forçados a mineralizar compostos orgânicos dificilmente degradáveis (JOSS et al., 2004). Entretanto, não existe uma clara correlação, dentro do sistema de tratamento, entre diferentes cargas orgânicas e a remoção de estrogênios (KOH et al., 2008).

Joss et al. (2004) propuseram um mecanismo de degradação de estrogênios (E1, E2 e EE2). As principais reações envolvidas durante a transformação biológica são: clivagem dos conjugados (glucuronídeos e sulfatos) para os três compostos; oxidação de E2 para E1 na presença de oxigênio; em condições de ausência de oxigênio e nitrato, com apenas E1 inicialmente presente, ocorre a redução de E1 para E2 e posterior degradação de ambos; degradação de E1 para produtos desconhecidos; e a degradação de EE2 para metabólitos desconhecidos, em quantidades significativas, somente em condições aeróbias. Além disso, dentro do reator ocorre a sorção dos compostos no lodo.

Em ETEs, a biodegradação ocorre, principalmente, em condições aeróbias, através do metabolismo biológico e das reações de transformação que podem desempenhar um papel significativo na remoção de estrogênio, pois os microrganismos presentes têm o potencial de utilizá-los como fonte de carbono nas reações bioquímicas (KOH et al., 2008; BASILE et al., 2011).

Os estrogênios podem ser degradados por duas formas principais: pelo uso direto como doadores de elétrons por organismos heterotróficos ou por cometabolismo. No primeiro caso, os microrganismos utilizam hormônios como fonte de carbono e/ou energia para o crescimento microbiano. O cometabolismo é um importante processo de biodegradação, observado quando as bactérias utilizam suas enzimas existentes para degradar hormônios. Desta forma, um composto orgânico é modificado, mas não é utilizado para crescimento (HAMID; ESKICIOGLU, 2012; YU; RULA; KUNG-HUI, 2013).

Esta degradação cometabólica, de estrogênios e muitos compostos orgânicos de baixo peso molecular, pode ser realizada por bactérias oxidadoras de amônia (AOB, do inglês *ammonia-oxidizing bacteria*) (VADER et al., 2000; REN et al., 2007b). Além disso, Vader et al. (2000) demonstram em seus resultados que as bactérias nitrificantes agem não somente em compostos orgânicos de baixo peso molecular, mas também em compostos sintéticos como EE2.

O sistema de lodos ativados nitrificantes é usado para oxidar amônia para nitrito e nitrato. *Nitrosomonas europaea* (*N. europaea*), uma bactéria quimiolitotrófica obrigatória produtora de enzimas monooxigenase, é usualmente responsável por catalisar a oxidação da amônia para nitrito em solos, águas naturais e lodos ativados, derivando sua energia para crescimento a partir desta oxidação. Vários grupos de bactérias que produzem enzimas monooxigenase são conhecidos por cometabolizar aerobicamente compostos orgânicos (VADER et al., 2000; SHI et al., 2004).

Várias pesquisas foram realizadas com o intuito de avaliar a biodegradação de estrogênios presentes em esgoto doméstico por processos biológicos. Estes estudos têm abordado ensaios de bancada de curta duração, considerando diferentes condições operacionais em termos de sistema e concentração de diferentes variáveis.

Li et al. (2005) verificaram que a degradação do 17 β -estradiol (E2) depende fortemente da concentração do analito, da temperatura e do conteúdo de sólidos suspensos voláteis. Li et al. (2008) observaram que a presença de diferentes concentrações de glicose como fonte de carbono adicional prejudicava a degradação de E2.

Hashimoto e Murakami (2009) avaliaram a presença de 17 α -etinilestradiol (EE2) nas fases líquida e sólida de lodos ativados e verificaram uma fase lag de 2 h e a completa remoção e degradação de EE2 após 24 h. Além disso, Chang et al. (2006) consideraram a degradação da estrona (E1) e E2 em ensaios de curta duração (72 h), e verificaram que tanto E1 quanto E2 foram removidos (em aproximadamente 100%) quando concentrações iniciais de 100 e 1000 mg/L foram utilizadas. Desmiarti e Li (2013) observaram que E1 e E2 foram completamente degradados após 8 h em condições aeróbias, tendo E2 desaparecido muito mais rápido do que E1.

Ternes, Kreckel e Mueller (1999) avaliaram duas concentrações diferentes (1000 e 1,0 μ g/L) de E1, E2, EE2, entre outros compostos, em condições aeróbias, durante 72 h de ensaio. Utilizando a concentração mais alta, a degradação do E2 foi alcançada em menos de 10 h, porém a estrona produzida foi degradada em 72 h. Já com a concentração menor, em apenas 5 h a estrona gerada já havia sido degradada, e o E2 foi degradado em menos de 3 h.

No trabalho realizado por Clouzot (2009), os testes foram realizados utilizando-se dois tipos de lodos coletados em uma ETE: um passou por um período de aclimação e o outro foi usado logo após sua coleta. O lodo aclimatado foi capaz de realizar a biodegradação do EE2,

o que não ocorreu com o lodo sem aclimatação. O procedimento de aclimatação foi realizado para favorecer o crescimento das bactérias autotróficas e inibir o crescimento das bactérias heterotróficas, o que fez com que a atividade nitrificante fosse triplicada.

2.3.2.1 Cultivo de microrganismos

Diversos estudos já foram realizados a partir do cultivo de microrganismos, utilizando estrogênios como única fonte de carbono adicionada ao sistema. Estes trabalhos tinham como objetivo selecionar microrganismos específicos, para uso em biotecnologias de enriquecimento, com o intuito de maximizar a degradação de compostos orgânicos em sistemas convencionais de tratamento de esgoto (BASILE et al., 2011).

Os resultados obtidos por Shi et al. (2004) indicam que um lodo ativado nitrificante (LAN) e *N. europaea* degradaram significativamente E1, E2, E3 e EE2, sendo que diferentes caminhos de degradação foram observados para E2. E1 foi produzido quando a degradação foi realizada pelo lodo, e não foi gerado durante a degradação com *N. europaea*. Portanto a degradação de E2 via E1 pelo LAN é realizada por outras bactérias heterotróficas e não por bactérias nitrificantes como *N. europaea* (SHI et al., 2004).

Shi et al. (2004) realizaram ensaios com o LAN na presença de aliltiouréia (ATU), um inibidor da ação da enzima amônia monooxigenase (AMO - do inglês, ammonia monooxygenase). Embora a degradação da amônia tenha sido inibida, a degradação dos estrogênios continuou sendo observada, provavelmente devido à ação de outros microrganismos, sendo esta degradação mais pronunciada para os estrogênios naturais.

A biodegradação é apresentada como a principal forma de remoção dos estrogênios durante o tratamento de esgoto; entretanto pouco se conhece sobre os microrganismos responsáveis por esta degradação. O estudo de Yu, Roh e Chu (2007) apresenta 14 culturas isoladas de lodo ativado e três padrões distintos de degradação para 17 β -estradiol e estrona, considerando as seguintes hipóteses: muitos tipos diferentes de bactérias, capazes de degradar estrogênios, estão presentes no lodo ativado; e suas diferentes habilidades de degradação contribuem para uma ampla faixa de remoção de estrogênio, o que é observado em muitos estudos.

O estudo realizado por Weber et al. (2005) avaliou a degradação dos estrogênios a partir de uma cultura enriquecida, após seis repetidas subculturas. Além desta, uma cultura mista, composta por duas cepas de bactérias isoladas, teve sua capacidade de degradação avaliada. O melhor resultado foi obtido com a cultura mista, onde a degradação de E1, E2 e E3 foi alcançada dentro de 2 dias. A degradação de E2 foi acompanhada pela formação de E1 e a transformação de E1 ocorreu mais rapidamente quando a cultura mista foi utilizada.

A cepa obtida por Haiyan et al. (2007), isolada a partir de uma amostra de lodo ativado, proveniente da ETE de uma indústria produtora de medicamentos contraceptivos, foi capaz de degradar EE2 após a identificação de uma fase lag, com duração aproximada de dois dias, para então iniciar seu crescimento a partir da degradação de EE2 (87% em 10 dias, concentração inicial de 30 mg/L). Os autores identificaram os produtos formados e propuseram uma via catabólica responsável pela degradação de EE2.

Pauwels et al. (2008) avaliaram a capacidade de degradação dos hormônios, por cepas selecionadas a partir de amostras de lodo ativado cultivadas na presença de 50 mg/L de EE2. A degradação de 5 mg/L de EE2 foi avaliada durante 38 dias, juntamente com o fornecimento de E2 (2,5 e 5 mg/L) em quatro momentos distintos (dias: 1, 7, 15 e 29). Todas as espécies cultivadas foram capazes de degradar aproximadamente 97% de EE2 após 38 dias. O composto EE2 não foi removido na ausência de E2, portanto, através do processo de cometabolismo, a presença de E2 contribuiu para a remoção de EE2. Além disso, foram conduzidos testes onde a razão de E2/EE2 foi aumentada de zero a cinco, e o melhor resultado (95% de remoção de EE2 em 5 dias) foi obtido com a maior concentração de E2 adotada.

O trabalho de Zhou et al. (2013) apresenta o isolamento de onze bactérias, a partir de amostras de lodo ativado, a avaliação da capacidade de degradação de cinco compostos diferentes, e o crescimento dos microrganismos em fontes de carbono diversas. A diluição de 10^{-9} da concentração inicial de lodo ativado foi capaz de degradar E2 (1 mg/L) em 3 dias. A bactéria identificada como EsD8, cultivada em agar R2A atingiu uma degradação de E2 em níveis inferiores ao limite de detecção do método utilizado.

Li et al. (2012) avaliaram o desempenho de uma cepa isolada a partir de reatores de bancada inoculados com lodo ativado, e alimentados a cada 7 dias com um meio de nitrato saturado com E2 ou E1 (3 mg/L). Após 78 dias de enriquecimento, as bactérias degradadoras

de estrogênio foram isoladas utilizando placas de R2A com E2 ou E1. A degradação de E2 pela bactéria *S. maltophilia* ZL1 isolada, apresentou 3 fases, sendo observada a conversão de E2 para E1. Ao fim do tratamento E2 foi degradado em aproximadamente 100% e E1 em 50%.

Hashimoto et al. (2010) isolaram a bactéria JEM-1 do lodo ativado e quantificaram sua presença, em dois diferentes sistemas de tratamento de esgoto, lodos ativados e valo de oxidação. O aumento no número de células da bactéria foi proporcionalmente acompanhado pela maior porcentagem de remoção de E1. Em experimentos em dois reatores de bancada, um reator foi inoculado com a bactéria JEM-1, e o outro foi utilizado como controle. Uma relação linear foi observada entre a quantidade de células e a concentração efluente de hormônios. Os valores médios de remoção para E1 e E2 foram de 81 e 94%, para o reator inoculado, e de 53 e 85%, para o reator sem inoculação, respectivamente.

Na Tabela 2.3 são indicados alguns dos microrganismos encontrados e identificados como capazes de realizar a degradação de hormônios.

Tabela 2.3 - Microrganismos identificados como capazes de degradar hormônios e capacidade de degradação em alguns estudos.

Gênero / Espécie	Composto	Capacidade degradação (%)	Referências
<i>Acinetobacter</i> sp.	E2 e EE2	> 99 % e 85%	Pauwels et al. (2008)
<i>Sphingobacterium</i> sp. JCR5	EE2 (única fonte de carbono e energia)	87% (30 mg/L) dentro de 10 d a 30 °C	Haiyan et al. (2007)
<i>Novosphingobium</i>	E2	87% (30 mg/mL) (50 d) 75% (10 mg/mL) (25 d)	Fujii et al. (2002)
<i>Rhodococcus zopfii</i> Y 50158	E2, E1, E3, e EE2 (100 mg/L 10 mL)	81% (2 h), 91% (3 h), 96% (4 h), 70% (6 h). 100% (24 h)	Yoshimoto et al. (2004)
<i>Rhodococcus equi</i> Y50155, Y 50156, e Y 50157	E2, E1, e EE2 (100 mg/L, 10 mL)	80% (5 h) e 99% (24 h) 80% (8 h) e 99% (24 h) 70% (8 h) e 80% (24 h)	Yoshimoto et al. (2004)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TJ1	E2 (única fonte de carbono e energia)	99% (20 mg/L) em 4 dias	Zeng et al. (2009)
<i>Sphingomonas</i> KC8	E2 (2,5 mg/L)	92% (5 d) e 76% (7 d) meio de crescimento com e sem E2	Roh e Chu (2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	E2 (1 mg/L) E1	100% (4 d) 40% do metabolito E1	Jiang, Yang e Chen (2010)
<i>Fusarium proliferatum</i>	EE2 (25 mg/L)	97% em 15 d	Shi et al. (2002)
<i>R. erythropolis</i> e <i>R. equi</i>	EE2 (1,4 mg/L)	47 e 39% em 13 e 65 h 2,5 mg/L de glicose	O'Grady, Evangelista e Yargeau (2009)

2.4 PROCESSOS DE REMOÇÃO DE ESTROGÊNIO DO ESGOTO

Existem diversas limitações relacionadas ao entendimento do caminho percorrido pelos hormônios em um sistema de tratamento em grande escala, como: mudanças sazonais (temperatura e chuvas), variações na carga de entrada (descargas inesperadas), e especiação (estrogênios conjugados ou não conjugados). Além disso, a sorção destes compostos na superfície dos sólidos confunde a interpretação devido à grande diferença entre o tempo de permanência do líquido e dos sólidos no sistema (SUIDAN et al., 2005).

Nas simulações de tratamento de esgoto, realizadas em escala de bancada, podem ser obtidas informações importantes, porém a extrapolação direta não é recomendada, principalmente devido ao nível de concentração utilizada ($\mu\text{g/L}$) nos testes, valor muito maior do que os encontrados em amostras reais (SUIDAN et al., 2005).

Os processos convencionais de tratamento de esgoto existentes não são eficazes para garantir a remoção total dos estrogênios (LINDBLOM et al., 2009). Portanto, as ações de remoção e controle de hormônios estão baseadas em dois tipos de intervenção: otimização das condições operacionais, existentes na planta de tratamento; e modernização das instalações do sistema convencional, com a incorporação de novas tecnologias no final do processo. Em ambos os casos, o processo pode ser destrutivo ou conservativo, dependendo se o composto é degradado ou transferido para outra fase (BASILE et al., 2011). A Tabela 2.4 sumariza as possibilidades existentes para aumentar a remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgoto (KOH et al., 2008).

A extensão da biodegradação de um composto específico em ETEs, será uma função das condições operacionais (configuração da planta, TDH, TRS, potencial redox, parâmetros ambientais) bem como de parâmetros específicos do composto (potencial de sorção e degradabilidade). Outros fatores incluem o tempo que o esgoto leva para chegar a ETE, o estado nutricional, a carga orgânica, o tipo de tratamento, a atividade e estabilidade da biomassa residente, e o cultivo de microrganismos específicos. A habilidade em aperfeiçoar e controlar a remoção de um composto no sistema de lodos ativados depende do entendimento destes parâmetros e como eles interagem com o processo de remoção (JOHNSON, BELFROID e DI CORCIA, 2000; KOH et al., 2008; LINDBLOM et al., 2009).

Tabela 2.4 – Formas de aprimorar a remoção de estrogênios desde a geração até o fim do processo de tratamento de esgoto.

Separação na origem
Consideração: (1) separar urina de resíduo fecal; (2) separar resíduos industriais; (3) ETE fechada para prevenir diluição e controlar TDH.
Tratamento primário
Opções possíveis: (1) aumentar TRS; (2) introduzir biofilme; (3) fazer reciclo do lodo do tratamento secundário.
Tratamento secundário
Otimização operacional: (1) maior TRS; (2) maior TDH; (3) temperatura constante (22-25 °C); (4) bioremediação com microrganismo seletivo. Processos alternativos: (1) lodo ativado e nitrificação; (2) bioreator a membrana; (3) aumentar a remoção de nutrientes.
Tratamento terciário
Processos físicos: (1) carvão ativado granular; (2) nanofiltração e ultrafiltração. Processos químicos: (1) dióxido de cloro; (2) hipoclorito de sódio; (3) ozônio; (4) fotólise; (5) irradiação ultravioleta (UV); (6) íon ferrato; (7) dióxido de manganês; (8) dióxido de titânio.

Fonte: Koh et al. (2008).

Processos biológicos são, usualmente, o meio mais viável, economicamente, na remoção de compostos orgânicos do esgoto. Métodos como osmose inversa e a adsorção em carvão ativado somente transferem o poluente de uma fase para outra, e não resolvem o problema ambiental. A oxidação química, como processo oxidativo avançado tem sido uma alternativa eficiente na remoção de baixos níveis de estrogênio (KOH et al., 2008). Entretanto, ainda não é uma tecnologia economicamente viável, e cuidados são necessários com relação aos produtos químicos, pois estes são reativos e produzem subprodutos de efeitos desconhecidos (BOLONG et al., 2009).

A otimização dos parâmetros operacionais em uma ETE, com a adoção de maiores TDH e TRS, em conjunto com a remoção de nutrientes, e variação das condições de oxi-redução permite tratar parcialmente os estrogênios. No entanto, estas ações também influenciam no tamanho da planta de tratamento e em outros critérios de projeto (KOH et al., 2008; BOLONG et al., 2009).

2.4.1 Sistemas de lodos ativados (LA)

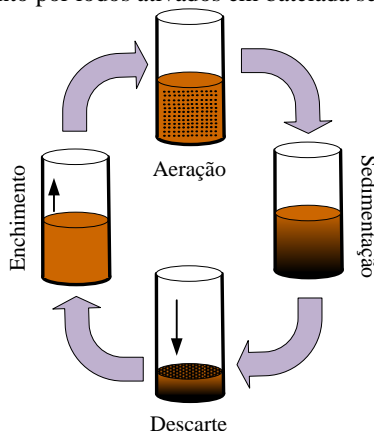
O tratamento por lodos ativados é um processo biológico onde o esgoto afluente, na presença de oxigênio dissolvido, agitação mecânica e pelo crescimento e atuação de microrganismos específicos, forma flocos denominados lodo ativado ou lodo biológico. Essa fase do tratamento objetiva a remoção da matéria orgânica biodegradável presente nos esgotos. Após essa etapa, a fase sólida é separada da fase líquida em outra unidade operacional denominada decantador. O lodo ativado separado retorna para o processo ou é retirado para tratamento específico ou destinação final, enquanto o esgoto já tratado é retirado através do vertedor do decantador, no qual ocorreu a separação, e encaminhado para o corpo receptor (JORDÃO e PESSOA, 2005).

Segundo Liu, Kanjo e Mizutami (2009), dentre os sistemas de tratamento de esgoto existentes, o processo de lodos ativados é o mais amplamente utilizado no mundo.

No sistema convencional, o TRS é usualmente da ordem de 4 a 10 dias e o TDH no reator, da ordem de 6 a 8 h. Na modalidade aeração prolongada, normalmente o sistema não possui decantador primário e o TRS varia entre 18 e 30 dias. Com relação ao fluxo, o reator pode operar de forma contínua, onde estarão presentes, além do tanque de aeração, dois decantadores, um primário e um secundário, ou intermitente (batelada), onde em apenas um tanque as fases de aeração, decantação e retirada passam a ser sequências no tempo (VON SPERLING, 2012).

Na Figura 2.4 são apresentadas as principais etapas envolvidas no processo de tratamento por lodos ativados em batelada sequencial. O estabelecimento de ciclos de operação com duração definida, possibilita a realização de todas as etapas em um mesmo tanque. A duração de cada ciclo, bem como das etapas que o compõem, é estabelecida em função da vazão afluente, das características do esgoto e da biomassa, e das necessidades do processo. Dependendo do objetivo do tratamento, modificações podem ser incorporadas ao sistema, como a forma de alimentação e retirada e a inclusão de diferentes etapas no ciclo de tratamento, como anóxica e anaeróbia (VON SPERLING, 2012).

Figura 2.4 – Representação esquemática das etapas envolvidas no processo de tratamento por lodos ativados em batelada sequencial.



2.4.1.1 Remoção de estrogênios nos sistemas LAs

Embora seja reconhecido que a tecnologia de lodos ativados é capaz de remover DEs, nem todos os compostos são completamente degradados ou convertidos nestes sistemas (BOLONG et al., 2009).

Apesar da existência de muitos estudos comparando a eficiência de remoção entre sistemas de tratamento biológico, os mecanismos envolvidos na biotransformação de estrogênios em sistemas de lodos ativados não são bem compreendidos. Normalmente a biodegradação de estrogênios difere de uma ETE para outra. Portanto, é essencial entender o mecanismo envolvido na remoção para possibilitar a otimização do processo e das condições operacionais que favoreçam a remoção de DEs de águas residuárias (SKOTNICKA-PITAK et al., 2008).

Os sistemas de lodos ativados apresentam diversas variações, e muitas delas já foram avaliadas em relação à remoção dos estrogênios. Diversos trabalhos relacionam a remoção destes compostos aos processos de remoção de nutrientes, como a nitrificação, e a presença de bactérias nitrificantes (GUSSEME et al., 2009; REN et al., 2007b; SHI et al., 2004; VADER et al., 2000; YI; HARPER 2007a).

Na Europa, o sistema de tratamento de esgoto composto por lodos ativados é o mais utilizado e, por este motivo, vários trabalhos já avaliaram a eficiência de remoção de estrogênio através deste processo. Uma remoção de hormônios muito baixa pode indicar a necessidade de um tratamento terciário adicional, enquanto que uma eficiência de 80-

90% de remoção significa que o processo pode ser manipulado e atingir maiores remoções (JOHNSON; BELFROID; DI CORCIA, 2000).

Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000) avaliaram estações de tratamento existentes na Europa, e valores obtidos por outros autores, em diferentes países, e obtiveram valores médios de remoção de $74 \pm 27\%$ de E1 (nove estações) e $88 \pm 13\%$ de E2 (sete estações) para amostras compostas coletadas em diferentes estações de tratamento. A maioria das ETEs avaliadas pelos autores, na Alemanha e na Itália, apresentaram valores de concentração de E1 e E2 no esgoto tratado menores do que o limite de detecção do método analítico.

Em um estudo realizado por Ternes et al. (1999), foram encontrados estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos na ETE da Penha/RJ. No esgoto bruto os estrogênios E2 e E1 foram detectados nas concentrações de $0,021 \mu\text{g/L}$ e $0,04 \mu\text{g/L}$, respectivamente. As taxas observadas de remoção foram de 83% para E1 e 99,9% para E2, para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados. Para EE2, as taxas de remoção na ETE foram de 64 e 78% para os sistemas de filtro biológico e lodos ativados, respectivamente.

Ren et al. (2007b) avaliaram a influência da carga orgânica (0,5, 1,6 e 4,1 kgCOT/kgSS.d) na degradação de estrogênio e observaram que uma carga orgânica mais elevada tende a resultar em uma baixa oxidação de amônia e, conseqüentemente, em uma baixa degradação de estrogênio. Portanto a degradação de estrogênio é diretamente afetada tanto pela taxa de carga orgânica como pela oxidação da amônia. Os autores também constataram que o cometabolismo de AOB foi o mecanismo de degradação dominante na remoção de E1, E2 e EE2 no sistema de lodos ativados com nitrificação.

Ainda no trabalho realizado por Ren et al. (2007b) dois substratos diferentes, glicose e cloreto de amônia, foram utilizados para avaliar o comportamento dos microrganismos heterotróficos e autotróficos, respectivamente, na biodegradação de E1 em lodo ativado nitrificante. A partir dos resultados, os autores verificaram que o lodo estudado foi capaz de degradar E1 mesmo na ausência de amônia, e E1 foi usado como substrato pelas bactérias heterotróficas quando outras fontes de carbono, facilmente assimiláveis, não estavam disponíveis.

Um dos objetivos da pesquisa realizada por Pholchan et al. (2008) foi investigar o destino de estrogênios (E1, E2, e EE2) em um reator em batelada sequencial (SBR - sequencing batch reactor), capaz de promover a acumulação de nitrito, em diferentes TRSs, e em condições estritamente aeróbias. Os autores partiram do pressuposto de

que a eficiência de remoção de estrogênicos é maior em longos tempos de retenção de sólidos. Isto pode ser explicado pela possibilidade da presença de uma maior diversidade microbiana, e a presença de microrganismos específicos de crescimento lento, como AOB, em reatores que operam em longos TRS.

Pholchan et al. (2008) demonstraram que um biorreator capaz de acumular nitrito também pode remover os estrogênicos de forma eficiente. Os resultados obtidos mostraram que a remoção de E1 e E2 pode ser esperada em reatores projetados para acumular nitrito. No entanto, a extensão do acúmulo de nitrito deve ser limitada, pois dois efeitos foram verificados em concentrações superiores a 70 mg/L de nitrito: reduzida remoção de EE2; e toxicidade para AOB e AMO.

Hashimoto et al. (2010) compararam a remoção de estrogênicos em duas plantas de tratamento de esgoto de diferentes sistemas, lodo ativado convencional e valo de oxidação. Os resultados obtidos mostram que a remoção dos hormônios naturais E1 e E2 foi maior (80 e 91%, respectivamente) no sistema de valo de oxidação do que no sistema de lodos ativados (– 59 e 81%, respectivamente). Esta diferença foi atribuída aos maiores TRS e TDH praticados no sistema de valo de oxidação (23 d e 34 h) em comparação com o lodo ativado (7,3 d e 9 h).

Nos ensaios realizados por Roh e Chu (2011), com a cepa KC8 previamente inoculada em um SBR, a remoção de estrogênio em TRS de 10 e 20 dias foi maior do que em TRS de 5 dias, apesar da diminuição na quantidade de determinadas bactérias, inclusive da KC8, que pode ser devido ao decaimento microbiano ou a competição por nutrientes com outros microrganismos presentes no sistema. Segundo os autores, muitos fatores estão envolvidos na degradação dos estrogênicos, como a presença de microrganismos desconhecidos, a cinética de crescimento e degradação, e os efeitos dos nutrientes na habilidade dos microrganismos capazes de realizar a degradação. A degradação do estrogênio ocorreu em TRS maiores, em partes, provavelmente devido à presença de baixa concentração de KC8 e de degradantes desconhecidos de estrogênio de crescimento lento (ROH e CHU, 2011).

Além dos trabalhos apresentados acima, vários outros autores avaliaram a remoção de estrogênicos em sistemas de lodos ativados de diferentes configurações, alguns deles são apresentados na Tabela 2.5. Nesta, além das porcentagens de remoção obtidas por cada trabalho, constam também as principais condições adotadas, como a escala do sistema, os tempos de retenção de sólidos e a detenção hidráulica, e a concentração inicial dos compostos.

Tabela 2.5 - Capacidade de degradação de hormônios utilizando sistemas de lodos ativados.

Processo	Escala	TRS (d)	TDH (h)	Esgoto	Concentração de hormônios	Remoção	Referências
SBR	6 L	1,7 a 17,1		Sintético	1 µg/L E1, E2 e EE2	100% E2, 100% E1 TRS 17,1 d, > 57% TRS ≥ 7,5 d	Pholchan et al. (2008)
CAS	6 L	10 e 20	12	Real	10 µg/L de E2	> 99% em TRS de 20 d	López-Fernández et al. (2013)
SBR	2 L	20 e 40	33	Sintético	50, 100 e 500 µg/L E2 e EE2	De 99,83 a 99,99% E2 e EE2	Racz, Muller e Goel (2012)
CAS	3,8 L	3 e 20	5 e 20	Sintético	38 a 570 ng/L	91 e 92% ΣE1 + E2 + E3 72 e 75% EE2	Bagnall et al. (2012)
SBR	Bancada	10	8	Sintético	E2, E3 e EE2 1 µg/L	> 95% E2 40% EE2 e 30% E1	Zhou et al. (2011)
CAS 3 estágios	120 L	6	6	Sintético	E1, E2 e EE2 100 ng/L	85% E1, 100% E2 e 60% EE2	Suidan et al. (2005)
CAS 3 estágios	120 L	6	6	Sintético	E1, E2 e EE2 100 ng/L	82% E1, 99% E2 e 42% EE2	Esperanza et al. (2007)
CAS	360 L	10 e 27	8	Esgoto municipal	0,9 a 101 ng/L de E1, E2 e EE2	93 e 84% E1, 90 e 92% E2, 29 e 41% EE2, para TRS de 10 e 27 d	Petrie et al. (2014)

SBR – reator em batelada sequencial (sequencing batch reactor)

CAS – reator de lodos ativados convencional (conventional activated sludge)

2.4.2 Biorreatores à membrana (MBR)

Membranas são definidas como um filme fino sólido que separa duas soluções, e atua como uma barreira seletiva para transporte de componentes destas soluções, quando aplicada algum tipo de força externa. A força-motriz que impulsiona a separação na maioria dos processos de separação por membranas utilizadas no tratamento de águas e esgotos é a pressão positiva ou negativa (vácuo). Nestes processos, o solvente é forçado, pela força motriz, a atravessar a barreira semipermeável constituída pela membrana, que retém contaminantes químicos e/ou particulados. Além disso, não ocorre transformação química ou biológica de compostos durante este processo (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001).

De acordo com Metcalf e Eddy (2003), os processos de filtração por membranas incluem: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose inversa, diálise e eletrodialise. Estes se distinguem entre si quanto: à natureza da força motriz; ao tamanho dos poros; ao mecanismo de separação; e ao material de confecção das membranas. Os processos de membranas mais apropriados para obter uma água de qualidade desejável, dependem dos compostos a serem eliminados da água bruta.

Os biorreatores à membrana são uma combinação da tecnologia de membranas com os reatores biológicos para o tratamento de esgoto. As membranas, quando associadas aos processos biológicos, são mais frequentemente usadas para substituir a etapa de sedimentação, separação entre a biomassa e o efluente (STEPHENSON et al., 2000).

Segundo Metcalf e Eddy (2003), os bioreatores à membrana apresentam algumas vantagens principais: tratamento de altas cargas orgânicas volumétricas em menor tempo de detenção hidráulica; menor produção de lodo, devido a maiores tempos de retenção da biomassa; operação em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, com potencialidade de nitrificação e desnitrificação; alta qualidade dos efluentes gerados em termos de turbidez, bactérias, sólidos suspensos totais (SST) e DBO (a membrana permite a retenção do material particulado produzindo um efluente livre de sólidos em suspensão); e menor espaço físico da unidade de tratamento, se comparado às tecnologias convencionais.

As limitações destes sistemas, de acordo com Metcalf e Eddy (2003) são: alto custo inicial; vida útil limitada das membranas (3 a 5

anos); alto consumo de energia; necessidade de controle da colmatação (adsorção das moléculas de soluto; obstrução de poros por partículas em suspensão; e depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana).

Assim como os sistemas de lodos ativados, o biorreator a membrana também pode ser operado na forma de batelada sequencial, e este apresenta algumas vantagens em relação ao biorreator a membrana convencional de fluxo contínuo. Zhang et al. (2006) compararam os dois sistemas em diferentes relações de demanda química de oxigênio/nitrogênio total (DQO/NT) de 3,4 a 28,2, e constataram que a remoção de amônia, nitrogênio total e fósforo total foi superior no reator em batelada. Belli et al. (2012) obtiveram eficiência média de remoção de nitrogênio total de 96%, confirmando a ocorrência dos processos de nitrificação e desnitrificação em sistemas operados em batelada sequencial.

2.4.2.1 Remoção de estrogênios nos sistemas MBRs

Para alcançar uma biodegradação de estrogênios mais completa, pode ser necessário um aumento no TRS ou no TDH da ETE existente. Considerando custo e espaço a aplicação da tecnologia de tratamento terciário avançado, para muitas comunidades, pode ser economicamente inviável. Portanto, o MBR pode representar uma opção viável pelas diversas vantagens já citadas (CLARA et al., 2005; KOH et al., 2008; BASILE et al., 2011). Além disso, a completa retenção física de microrganismos alcançada em um MBR, pode favorecer o cultivo e enriquecimento de microrganismos específicos de metabolismo lento, responsáveis, em parte, por realizar a degradação aeróbia dos estrogênios (ZUEHLKE et al., 2006).

O TRS é um parâmetro chave para o tratamento de águas residuárias em sistemas convencionais e MBRs. Em sistemas de tratamento operados em maiores TRS, o tempo de contato, a difusão dentro dos flocos, e a adaptação dos microrganismos para o substrato são melhorados. Na revisão realizada por Cirja et al. (2008), os autores observaram que valores de TRS entre 10 e 30 dias, permitem uma taxa de remoção suficiente para muitos dos micropoluentes investigados. A sorção dos micropoluentes é favorecida pelo alto conteúdo de biomassa, que é característico para reatores MBR e adicionalmente, a composição do lodo tem uma grande influência na degradação dos compostos (CIRJA et al., 2008).

Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) observaram que os parâmetros TRS e TDH influenciam claramente na remoção de estrogênios em um MBR. A remoção de E1 e EE2 foi afetada pela variação de TRS e TDH, enquanto que para a remoção de E2 estes parâmetros operacionais não influenciaram de forma perceptível. Os autores concluíram que o composto mais biodegradável foi o E2, seguido pelo E1, e o EE2 foi o estrogênio mais persistente.

Os autores Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) observaram que um aumento no TRS, talvez permita o desenvolvimento de microrganismos específicos dentro do MBR, estabelecendo assim, uma população diversificada de microrganismos com alta capacidade fisiológica para degradar E1, E2 e EE2. Portanto, o processo de biodegradação foi mais importante do que o processo de adsorção.

A remoção alcançada por Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) (Tabela 2.6) pode estar relacionada a três fatores: 1) a possível presença de microrganismos capazes de remover os estrogênios; 2) os microrganismos foram sujeitos a condições extremas de falta de alimento, impedindo o processo anabólico e permitindo apenas condições metabólicas, forçando os microrganismos a metabolizar estes três estrogênios; e 3) adsorção dos compostos na biomassa.

No trabalho realizado por Weber et al. (2005), E2 foi oxidado para E1 em 3 h pelo lodo do biorreator à membrana e em 7 h pelo lodo ativado convencional. Entretanto, não foi verificada diferença expressiva entre a taxa de conversão realizada pelo lodo do MBR (0,11 µg/h) e pelo lodo convencional (0,08 µg/h) em termos de grama de resíduo seco.

Nos resultados obtidos por Gaulke et al. (2009), o valor do coeficiente de degradação biológica para EE2, no reator MBR (TRS de 30 a 40 d) e no reator LA (TRS de 3 d), foi bastante similar, indicando que as bactérias heterotróficas responsáveis pela degradação de EE2 estão presentes em longos e curtos tempos de retenção de sólidos.

Trinh et al. (2012) avaliaram a remoção de 48 contaminantes orgânicos, em um MBR em escala real. Os estrogênios E2 e E1 apresentaram concentrações médias de aproximadamente, 50 e 100 ng/L, nas amostras de esgoto real. O sistema de tratamento avaliado apresentou eficiência de remoção em torno de 97 e 100% para estes compostos. E1 foi detectado no permeado na concentração de 1,5 ng/L e E2 não foi detectado.

Wu et al. (2011) obtiveram remoção média de EE2 de 87%, fazendo uso de um reator provido de quatro tanques, sendo eles:

anaeróbio, anóxico, aeróbio e de membrana em escala real. Já a remoção obtida para os hormônios naturais foi superior a 97%, sendo que a concentração média dos estrogênios no afluente apresentou valores entre 118 e 145 ng/L para os três compostos em amostras naturais.

Diversos trabalhos já avaliaram a remoção dos estrogênios em sistemas de tratamento compostos por biorreatores a membrana de diferentes configurações. Muitos deles relacionam a remoção destes compostos ao mecanismo de retenção de sólidos, o que permite a operação em maiores TRSs, bem como a completa retenção da biomassa no sistema. A eficiência de remoção obtida e as principais variáveis adotadas por estes autores são apresentadas na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Capacidade de degradação de hormônios utilizando sistemas aeróbio de biorreator a membrana.

Escala	TRS (d)	TDH (h)	Esgoto	Concentração de hormônios	Remoção	Referências
6 L	35, 45, 60, 75 e 95	7 e 12	Sintético	E1, E2 e EE2, 100 – 150 ng/L	> 98% em TRS 60 d e TDH 12 h	Estrada-Arriaga e Mijaylova, (2011)
6 L	20 e 80	6	Sintético	E1, E2 e EE2 0,7 – 0,97 µg/L	100% E2 e E1, TRS 80 d 78,1% EE2	Maeng et al. (2013)
20 L	Infinito	4, 2 e 1	Sintético	24, 49 e 97 µg/L.d de EE2	97,7%, em 4 h, com 29 µg/L.d. de EE2	Gusseme et al. (2009)
3 L	10 e 20	12	Real	10 µg/L de E2	> 99% em TRS de 20 d	López-Fernández et al. (2013)
Bancada	10	8	Sintético	E2, E3 e EE2 1 µg/L	> 95% E2, 65% EE2, e 55% E1	Zhou et al. (2011)
	20 e 40	8			> 95% E2, 90% E1 e > 90% EE2	
7,5 L	Infinito	6	Sintético	E2 5 µg/L	90% E2	Fan et al. (2014)
3 L	25	6	Sintético	E2 EE2 500 ng/L	89% E2 e 70,9% EE2	Yang, Zhou e Cicek (2012)
5 L	88	26	Sintético	E1, E2 e EE2 5 µg/L	> 90% E2, E1 e EE2 10% de EE2 adsorvido	Wijekoon et al. (2013)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Reúso de Águas (LaRA) e Integrado do Meio Ambiente (LIMA), ambos pertencentes ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi realizado em quatro etapas distintas, as quais objetivaram, de maneira geral, compreender o comportamento dos compostos em estudo, dois hormônios naturais (estrona, E1 e 17 β -estradiol, E2) e um sintético (17 α -etinilestradiol, EE2). Sendo elas:

- A primeira etapa compreendeu os ensaios cinéticos de curta duração (24 h), para observar a remoção de hormônios em diferentes condições: três meios; três concentrações de sólidos suspensos voláteis; três concentrações de metanol; três lodos ativados, provenientes de diferentes sistemas de tratamento; e um lodo inativado;
- A segunda etapa foi composta pela operação de um reator de enriquecimento, com o intuito de estabelecer condições favoráveis ao crescimento e reprodução de bactérias degradadoras de hormônios. A partir de amostras deste reator, foram realizados ensaios de cultivo de microrganismos;
- A terceira etapa foi realizada para avaliar preliminarmente o funcionamento do sistema de biorreator a membrana por 35 dias;
- A quarta etapa descreve o funcionamento e o desempenho de dois sistemas piloto de tratamento de esgoto, um biorreator a membrana e um reator de lodos ativados, na remoção dos compostos de interesse.

Nas seções subsequentes serão apresentados os materiais, os procedimentos e as características dos reatores utilizados, as formas de operação e monitoramento dos mesmos, bem como as análises para caracterização e quantificação das variáveis de interesse. Destaca-se que cada etapa foi realizada de forma independente.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Compostos de estudo (hormônios)

Neste trabalho foram estudados três hormônios, sendo dois deles naturais, estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2), e um sintético, 17 α -etinilestradiol (EE2). Estes compostos foram adquiridos junto à empresa

Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, com as seguintes especificações: β -Estradiol E1132 - padrão analítico; Estrona 46573 - VETRANAL™ padrão analítico e; 17 α -Etinilestradiol E4876 - \geq 98% de pureza.

A partir dos padrões adquiridos, foram preparadas soluções-estoque em álcool metílico grau HPLC, em diferentes concentrações para cada etapa do estudo, sendo: 100 e 400 mg/L (etapas 1 e 2); 200 mg/L (etapa 3); e 800 mg/L (etapa 4). As soluções-estoque foram armazenadas a - 20 °C por um período máximo de três meses. Soluções-estoque de estrogênio sem metanol foram também preparadas, a partir da dissolução dos compostos em água ultrapura, por meio de aquecimento a 50 °C em ultrassom, em diferentes concentrações (etapa 1: 1,5 mg/L, etapa 2: 1,5, 2,5 e 3,5 mg/L), e armazenadas a 4 °C por até 15 dias.

3.1.2 Inóculo (lodo)

Para o desenvolvimento de todas as etapas foi necessária a introdução de um inóculo no sistema de tratamento/reator. O lodo ativado, inóculo do sistema, utilizado nas etapas um, dois e três, foi coletado diretamente do tanque de aeração de uma estação de tratamento de esgoto (ETE), localizada em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Nesta planta de tratamento, 100% do esgoto afluente a ETE é doméstico, com uma vazão de 22.723 m³/dia, com capacidade para atender aproximadamente 150.000 habitantes. Por estas características, a planta foi considerada representativa para a avaliação proposta em termos de sistema de tratamento. Sendo este sistema composto por um seletor biológico e um sistema de lodos ativados operado na forma de aeração prolongada. Esta estação foi denominada ETE1.

Durante a etapa 1 foram utilizados dois lodos ativados amostrados no tanque de aeração de outras duas ETES localizadas na cidade de Florianópolis. A ETE2 é formada por lodos ativados operado na forma convencional como pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), e a ETE3 utiliza lodos ativados operado na forma de batelada sequencial.

Os lodos provenientes das ETES 2 e 3 não foram usados em outras etapas do trabalho por representarem sistemas de grande variação de cargas de entrada, o que se deve ao fato de estarem localizadas em regiões praianas onde o aumento da geração de esgoto na alta temporada é bastante representativo, em decorrência da atividade turística. Desta

forma, a amostragem do lodo não pode ser considerada representativa do sistema de tratamento para um extenso período operacional.

O lodo ativado selecionado como inóculo, para os reatores piloto utilizados na etapa 4, foi proveniente de um biorreator a membrana, híbrido de leito móvel, operado na forma de batelada sequencial para remoção de nutrientes, após 210 dias de operação. Este lodo foi selecionado, pois apresentou excelente remoção de matéria orgânica e compostos nitrogenados. Este sistema foi desenvolvido e monitorado para elaboração da dissertação de Kellner (2014) do mesmo grupo de pesquisa desta tese (Laboratório de Reúso de Águas - LaRA da UFSC).

3.1.3 Meio e esgoto sintético

Neste estudo o termo “meio” foi utilizado para se referir as soluções utilizadas nas etapas 1 e 2. Já o esgoto sintético é referente as soluções de alimentação dos reatores piloto utilizados nas etapas 3 e 4.

Durante a realização da etapa 1 foram utilizados três meios, um meio sintético (Tabela 3.1), como fonte de macro e micronutrientes, um meio, denominado de sobrenadante, referente ao líquido obtido após a sedimentação do lodo coletado na ETE1, este foi considerado como uma fonte natural de carbono, e finalmente, a água foi utilizada como um meio desprovido de fonte de carbono e de macro e micronutrientes.

A etapa 2 fez uso de apenas um meio, sendo este igual ao meio sintético utilizado na etapa 1, preparado a partir dos compostos e concentrações apresentados na Tabela 3.1.

As soluções de esgoto sintético utilizadas nas etapas 3 e 4, para abastecimento dos reatores piloto, foram constituídas por macro e micro nutrientes diluídos em água, conforme Tabela 3.2, sendo que a solução de elementos traço, para a etapa 4, foi a mesma apresentada na Tabela 3.1 com exceção do cloreto de cálcio.

A composição do esgoto sintético selecionada para a etapa três foi a mesma utilizada por Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) no estudo da remoção dos estrogênios E1, E2 e EE2 em um sistema piloto de MBR. Sendo que a fonte de carbono utilizada foi, apenas, hormônios e metanol. Já o esgoto sintético utilizado na etapa 4 possui em sua composição o acetato de sódio, como fonte de carbono e tampão, além dos hormônios e do metanol. O metanol foi utilizado como fonte de carbono e como solvente dos padrões de hormônios, pois estes são pouco solúveis em água.

Tabela 3.1 – Composição do meio sintético e da solução de elementos traço.

Composto	Concentração (g/L)	Solução-estoque de elementos traço	Concentração (g/L)
K ₂ HPO ₄	3,50	NaHCO ₃ ·10H ₂ O	2,00
KH ₂ PO ₄	1,50	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,30
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,20
NaCl	0,50	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,10
Elementos traço	1,00 mL/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,50
Extrato de levedura	0,005% (p/v)	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,02
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,50

Fonte: Yoshimoto et al. (2004)

Tabela 3.2 – Composição das soluções de esgoto sintético.

Composto* (etapa 3)	Concentração (mg/L)	Composto (etapa 4)	Concentração (mg/L)
CH ₃ OH	395,00	CH ₃ OH	98,75
NH ₄ Cl	90,00	CH ₃ COONa	815,00
K ₂ HPO ₄	9,00	KH ₂ PO ₄	65,00
KH ₂ PO ₄	8,40	NH ₄ Cl	160,50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	17,40	CaCl ₂ ·2H ₂ O	14,00
(NH ₄) ₆ Mo ₇ ·4H ₂ O	0,01	MgSO ₄ ·7H ₂ O	90,00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,40	Elementos traço	1,00 mL/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12,20	E1, E2 e EE2	100,00 µg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,13		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,04		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,03		
EDTA	0,02		
E1, E2 e EE2	100,00 µg/L		

*Fonte: Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Primeira etapa – Cinética de remoção de hormônios em diferentes condições experimentais

A primeira etapa compreendeu a degradação simultânea dos três estrogênios, fazendo uso de ensaios cinéticos de curta duração (0,5 a 24 h), para avaliar a remoção de hormônios pelos lodos coletados nas ETEs, pelos principais processos envolvidos nesta remoção, adsorção e biodegradação. Estes ensaios foram conduzidos em escala de bancada, em condições aeróbias. Os resultados foram usados como base para o estabelecimento das condições, que poderiam favorecer a remoção dos compostos de interesse, a serem usadas nas próximas etapas.

Apenas nesta etapa foi avaliada a remoção dos compostos pelo processo de adsorção. Para isso, uma porção do lodo coletado na ETE1 foi inativada através de esterilização em autoclave a 120 °C durante 30 min, como descrito por Chen e Hu (2010), Gusseme et al. (2009) e Li et al. (2005).

Os ensaios cinéticos foram realizados em 10 reatores aeróbios idênticos (volume total de cada reator 5 L). Difusores de ar foram instalados no interior de cada um dos reatores, e uma bomba foi usada para fornecer oxigênio necessário à manutenção das condições aeróbias.

Os reatores foram mantidos em um volume útil total de 750 mL, sendo a alimentação realizada uma única vez da seguinte maneira: lodo coletado na ETE, em quantidade suficiente para atingir os teores pretendidos de sólidos suspensos voláteis (SSV) (Tabela 3.3); meio correspondente (meio sintético, água ou sobrenadante); hormônios E1, E2, e EE2, dissolvidos em metanol ou em água ultrapura, adicionados simultaneamente na concentração de 100 µg/L. A maior concentração de metanol nos sistemas representa 0,1% (v/v). A presença do metanol muda a polaridade do meio, conseqüentemente diminui a adsorção dos compostos, entretanto, os ensaios comparativos de adsorção foram realizados com a mesma concentração de metanol.

Antes da distribuição do lodo entre os reatores e da adição do meio e dos hormônios, uma alíquota foi retirada para análise de reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE), com o objetivo de estudar os perfis das comunidades bacterianas presentes em cada uma das amostras de lodo.

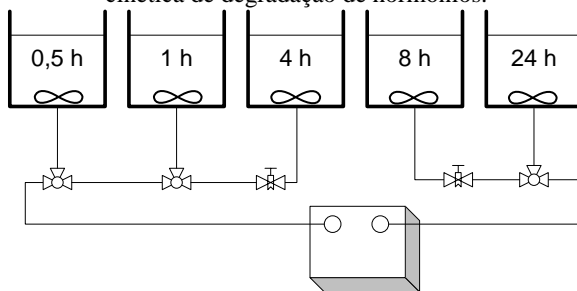
Todos os testes foram realizados em duplicata na ausência de luz, para evitar perdas por fotodegradação. Durante os ensaios, as condições

operacionais como temperatura, oxigênio e pH, foram mantidas iguais e constantes para todos os reatores, tendo-se variações apenas no tempo de contato (0,5, 1, 4, 8, e 24 h), conforme Figura 3.1, para cada reator.

Ao fim de cada tempo estabelecido, a aeração foi desligada, permitindo a sedimentação do material em suspensão. Uma alíquota do sobrenadante (50 mL para 0,5 e 1 h, 100 mL para 4 h, e 200 mL para 8 e 24 h) foi submetida a extração em fase sólida (SPE), seção 3.3.3, para limpeza da amostra e concentração dos analitos, posteriormente determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Foi realizado um ensaio, denominado de branco, nas mesmas condições anteriores, porém na ausência do lodo, para avaliar a possível remoção dos estrogênios por outras vias, como a interação com substâncias presentes no meio sintético ou com o metanol, ou através da adsorção dos compostos na superfície dos reatores.

Figura 3.1 - Representação esquemática do experimento para determinação cinética de degradação de hormônios.



Diferentes condições de tratamento foram utilizadas e avaliadas, conforme Tabela 3.3, onde as condições comparadas aparecem em destaque, sendo elas:

- Lodo ativado e inativado (remoção via adsorção), ensaios 01 e 02;
- Três concentrações de sólidos suspensos voláteis (SSV), ensaios 02 a 04;
- Três tipos de meio aquoso, ensaios 04 a 06;
- Três concentrações de metanol (utilizado como fonte de carbono), ensaios 06 a 08;
- Lodo proveniente de três diferentes tipos de tratamento (seção 3.1.2), ensaios 02, 09 e 10.

As demais condições foram mantidas constantes para efeito de comparação.

Tabela 3.3 – Condições experimentais para degradação aeróbia de hormônios.

Ensaio	Concentração de metanol (mg/L)	Concentração de SSV (mg/L)	Meio	Tipo e procedência do lodo
01	750,0 ^a	3000	Sintético	Inativado 1
02	750,0	3000	Sintético	Ativado 1
03	750,0	1000	Sintético	Ativado 1
04	750,0	2000	Sintético	Ativado 1
05	750,0	2000	Água	Ativado 1
06	750,0	2000	Sobrenadante	Ativado 1
07	197,5 ^b	2000	Sobrenadante	Ativado 1
08	0,0 ^c	2000	Sobrenadante	Ativado 1
09	750,0	3000	Sintético	Ativado 2
10	750,0	3000	Sintético	Ativado 3

a – DQO = 1200 ± 25 mg/L, b – DQO = 332 ± 28 mg/L, c – DQO = 66 ± 12 mg/L. Ativado 1 = ETE 1; ativado 2 = ETE 2; ativado 3 = ETE 3.

3.2.2 Segunda etapa – Cultivo de microrganismos

A segunda etapa teve como objetivo avaliar a remoção de hormônios pelo processo de biodegradação, por meio da obtenção de um consórcio bacteriano capaz de consumir os hormônios.

Para tanto, um reator aeróbio foi utilizado para realizar o enriquecimento do lodo ativado. O reator foi operado por 105 dias, sendo que, ao longo dos primeiros 70 dias foram monitoradas a concentração dos hormônios na saída do reator, e a diversidade da comunidade bacteriana presente no interior do reator.

A partir do consórcio bacteriano obtido no reator, foi realizada uma seleção de microrganismos através de técnicas de cultivo. A capacidade de degradação dos hormônios, pelo grupo de microrganismos selecionados, foi avaliada através de ensaios cinéticos.

3.2.2.1 Cultivo de microrganismos em reator de enriquecimento

O enriquecimento foi realizado em um reator piloto abastecido uma única vez com o lodo ativado proveniente da ETE1. A inicialização do reator foi realizada com 2300 mL de lodo ativado e 2000 mL de meio sintético, volume útil de 4,3 litros, sendo que a concentração inicial de SSV no sistema foi de 2000 mg/L. A alimentação com meio sintético, contendo nutrientes (Tabela 3.1), e solução dos três hormônios, em

concentrações conhecidas, dissolvidos em água ultrapura, foi realizada diariamente conforme Tabela 3.4, com o objetivo de favorecer o crescimento/replicação de bactérias capazes de consumir hormônios. A concentração inicial de hormônios foi estabelecida com base no estudo realizado por Yu, Roh e Chu (2007).

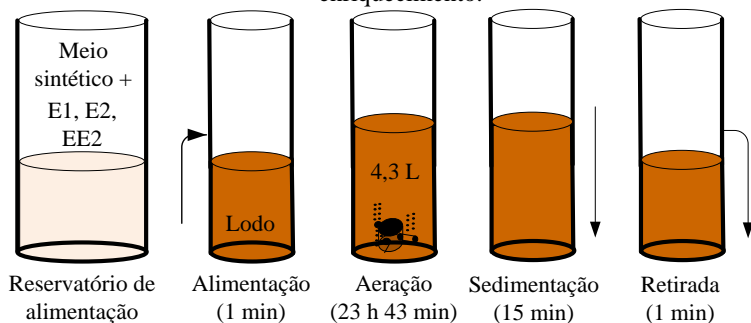
Observa-se na Tabela 3.4 que após 16 dias de operação as condições operacionais foram alteradas. Estas alterações foram necessárias devido a grande perda de biomassa ocorrida nos primeiros dias, portanto o volume de alimentação foi reduzido. A composição e a concentração foram alteradas devido à observação de um rápido consumo dos hormônios naturais e ao acúmulo do hormônio sintético. Este acúmulo também foi responsável pela retirada deste composto, da solução de abastecimento, a partir do dia 47.

O reator foi provido de um sistema de fornecimento de oxigênio (bombas e difusores de ar), para garantir as condições aeróbias necessárias, e foi mantido na ausência de luz a 25 °C. O reator foi operado na forma de batelada sequencial, sendo que cada ciclo de 24 h é composto pelas etapas apresentadas na representação esquemática da Figura 3.2, estes ciclos foram mantidos durante os primeiros 70 dias de forma ininterrupta. Este tempo foi estabelecido com base nos estudos realizados por Yoshimoto et al. (2004). No dia 71, a realização dos ciclos, compostos por etapas diárias de alimentação e descarte, foi cessada e o reator foi mantido em funcionamento por mais 34 dias sob as mesmas condições anteriores, conforme Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Condições de operação do reator de enriquecimento.

Dia de operação	Volume (mL/d) de alimentação e descarte	Composição da solução de abastecimento (%)		Concentração de hormônios (mg/L)		
		Meio	Hormônios	E1	E2	EE2
01-16	950	75	25	2,5	2,5	2,5
17-46	450	50	50	3,5	3,5	1,5
47-70	450	50	50	3,5	3,5	0,0
71	Interrupção das etapas de alimentação e descarte.					
71-105	Permanência sob aeração a 25 °C, na ausência de luz.					

Figura 3.2 – Representação esquemática das etapas de operação do reator de enriquecimento.



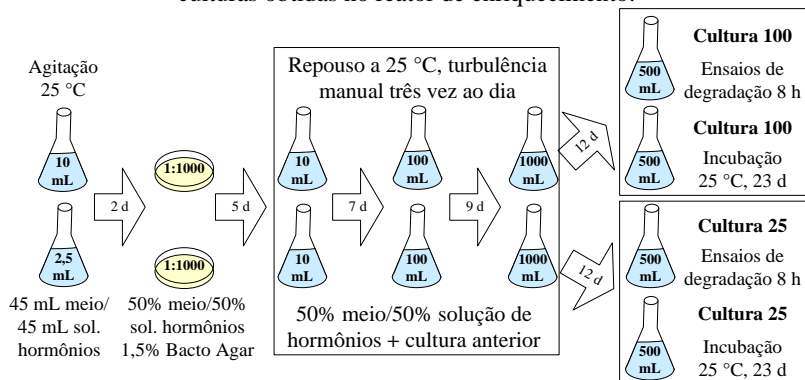
Ao longo do período em que ocorreram as etapas de alimentação e descarte, foram coletadas 30 amostras efluentes para determinar a concentração dos hormônios e avaliar o comportamento de degradação destes compostos. Também foram coletadas 10 amostras da biomassa do reator, em períodos espaçados, para caracterizar a diversidade da comunidade bacteriana, ou seja, diversidade de microrganismos, através da técnica de PCR-DGGE. Uma amostra efluente e uma amostra da biomassa também foram obtidas no dia 105 com o mesmo intuito.

3.2.2.2 Seleção de grupos de microrganismos

Para selecionar grupos de microrganismos foram adotados os procedimentos apresentados na Figura 3.3. Inicialmente duas quantidades diferentes da biomassa presente no reator da seção 3.2.2.1 (2,5 e 10 mL, diluídos em água para um volume final de 10 mL) foram adicionadas a erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL de meio sintético (Tabela 3.1) e 45 mL de solução de hormônios (3,5 mg/L de E1 e E2 e 1,0 mg/L de EE2).

Este conjunto ficou sob agitação a 25 °C por 48 h. Após este período, uma solução foi preparada para cada amostra, na diluição de 1000 vezes. Um volume igual a 50 µL de cada uma das soluções foi adicionado a placas de Petri contendo 50% de meio sintético (Tabela 3.1), 50% de solução de hormônios (3,5 mg/L de E1 e E2) e 1,5% de Bacto Agar, dissolvido no meio sintético.

Figura 3.3 – Procedimento para seleção de microrganismos utilizando as culturas obtidas no reator de enriquecimento.



As placas de Petri foram incubadas a 25 °C por aproximadamente cinco dias, até desenvolvimento das colônias. As colônias obtidas foram retiradas do Agar, com o auxílio de um palito estéril, sendo cada colônia transferida para erlenmeyers distintos contendo 5 mL de meio (Tabela 3.1), e 5 mL de solução de hormônios (3,5 mg/L de E1 e E2).

O surgimento da turbidez, indicando o crescimento dos microrganismos, foi constatado após 7, 9 e 12 dias para os volumes de 10, 100 e 1000 mL, respectivamente, conforme Figura 3.3. Cada solução obtida (10 e 100 mL) foi transferida para erlenmeyers contendo uma nova solução composta por 50% de meio e 50% de solução de hormônios (90 e 900 mL).

As soluções obtidas foram denominadas de cultura 25 (proveniente da quantidade inicial de 2,5 mL) e cultura 100 (proveniente da quantidade inicial de 10 mL), sendo que cada cultura foi separada em duas frações. A primeira foi utilizada para avaliar a degradação de hormônios em ensaios aeróbios de curta duração, 8 h. A segunda foi mantida a 25 °C sem aeração, em um erlenmeyers de 1 L, por mais 23 dias, para avaliar a possível degradação dos compostos utilizados durante o cultivo, E2 e E1 (Figura 3.3).

Os ensaios aeróbios de curta duração, realizados com as duas soluções obtidas ao fim do cultivo, foram conduzidos através da alíquotagem em diferentes volumes para cada tempo de ensaio (50 mL para 0 e 1 h; 100 mL para 2 e 4 h; e 200 mL para 8 h). Cada volume foi adicionado a um frasco cônico e a cada frasco foi adicionada uma

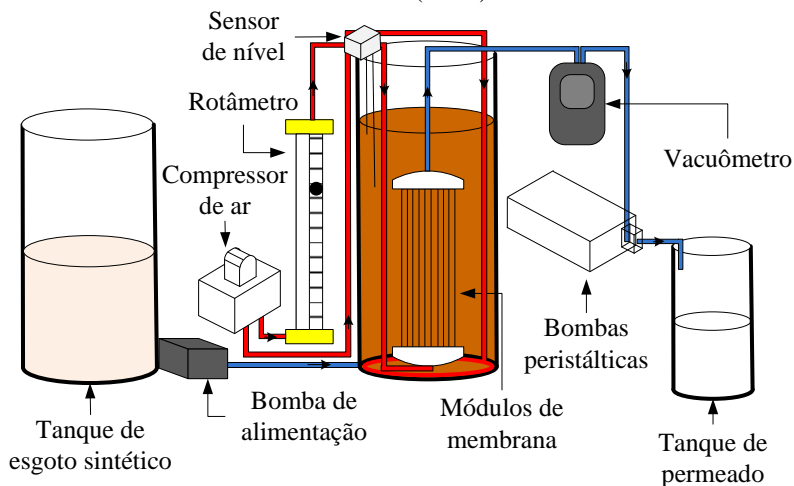
quantidade exata de solução de hormônios (400 mg/L dissolvida em metanol), para obter uma concentração inicial de 100 µg/L de E1 e E2. O sistema ficou sob aeração a 25 °C durante o tempo determinado de reação (0, 1, 2, 4 e 8 h), após este período, a amostra foi submetida a filtração e ao procedimento de extração em fase sólida para determinação da concentração de hormônios por HPLC.

3.2.3 Terceira etapa – Avaliação preliminar do biorreator a membranas na degradação de hormônios

O biorreator a membranas foi operado por um período de 35 dias para verificar se as condições operacionais, tanto de alimentação (inóculo e esgoto sintético) quanto de funcionamento (Tabela 3.5), eram adequadas para garantir um bom desempenho do reator em termos de eficiência de remoção de compostos orgânicos e nitrogenados.

O início da operação do sistema se deu através da adição do lodo ativado proveniente da ETE1 na concentração de 3000 mg/L de SSV, obtida através da diluição com esgoto sintético (Tabela 3.2). A representação esquemática do sistema piloto de biorreator à membrana (MBR) pode ser visualizada na Figura 3.4.

Figura 3.4 – Representação esquemática do sistema piloto de biorreator a membrana (MBR).



O reator tem capacidade total de 13 litros, o tanque para armazenamento de esgoto sintético possui igual capacidade e o tanque de coleta de permeado apresenta volume útil de 5 L. No interior do reator encontravam-se um módulo de membrana submerso, e sensores de nível para controlar o enchimento e a retirada de líquido do sistema. Todas as etapas referentes ao processo de tratamento foram conduzidas a partir de um painel de controle, previamente programado para realizar todas as operações automaticamente.

As condições operacionais adotadas para o sistema e as propriedades do módulo de membrana estão apresentadas nas Tabelas 3.5 e 3.6, respectivamente. As condições como volume e vazão foram limitadas as possibilidades do sistema piloto, o fluxo foi mantido baixo para evitar a colmatção das fibras do módulo de membrana. A duração de cada ciclo, o TRH, e a taxa de troca volumétrica foram estabelecidos com base nos trabalhos já desenvolvidos no laboratório (KELLNER, 2014; BELLI et al., 2014b). O TRS foi mantido em 30 dias para possibilitar a posterior comparação com o sistema de lodos ativados. A concentração de hormônios foi adotada com base no trabalho de Racz, Muller e Goel (2012).

Tabela 3.5 – Descrição do piloto e parâmetros operacionais adotados.

Condição	Valor	Unidade
Vazão do sistema	6,0	L/d
Vazão de filtração efetiva	0,3704	L/h
Volume máximo do reator	5,0	L
Volume mínimo do reator	4,0	L
Volume tratado por ciclo	1,0	L
Taxa de troca volumétrica	20,0	%
Tempo de aeração sem filtração por ciclo	60	min
Tempo de filtração com aeração por ciclo	162	min
Tempo relaxamento com aeração por ciclo	18	min
Duração de cada ciclo	240	min
Número de ciclos por dia	6	ciclos
Fluxo de filtração	2,08	L/m ² .h
Tempo de detenção hidráulica (TDH)	20	h
Tempos de retenção de sólidos (TRS)	30	d

Tabela 3.6 – Características do módulo de membrana.

Propriedades	Especificação
Material da membrana	Polieterimida
Porosidade	Microfiltração
Diâmetro dos poros	0,3 μm
Área de filtração	0,178 m^2
Conformação	Fibra oca
Comprimento do módulo	34 cm
Diâmetro do módulo	9 cm
Comprimento das fibras	22 cm
Fabricante	PAM membranas

Para promover a filtração através da membrana, o sistema conta com uma bomba peristáltica (Watson Marlow 505S), sendo que a mesma operou de maneira intermitente, com nove minutos de filtração e um minuto de relaxamento, com o intuito de minimizar a colmatção da membrana.

O ar, necessário para manter a homogeneidade da biomassa e para a injeção de oxigênio no sistema, foi fornecido por um soprador de ar (Thomas LP-120H) por duas vias distintas, controladas por válvulas reguladoras. Uma delas foi ligada diretamente a uma mangueira localizada internamente ao redor do reator. A outra via passa pelo rotâmetro (Omel, 0,0 a 8,0 NL/min), para medida da vazão de ar que entra no sistema, através da extremidade inferior do módulo de membrana, e segue por entre as fibras com o intuito de impedir o acúmulo de sólidos na superfície das mesmas. Um sensor de pressão, vacuômetro (Homis VDR 920), localizado na tubulação do permeado, foi responsável por medir os dados da pressão transmembrana (PTM).

3.2.4 Quarta etapa – Operação dos sistemas de biorreator a membrana e lodos ativados

Finalmente, na quarta etapa, através do monitoramento de dois sistemas piloto de reatores aeróbios: um biorreator a membrana (MBR) e um reator de lodos ativados (LA), ambos operados em batelada sequencial, avaliou-se, comparativamente, o comportamento destes em relação à capacidade de remoção de hormônios de um esgoto sintético. A eficiência de remoção dos compostos orgânicos, nitrogenados e hormônios, bem como a diversidade da comunidade bacteriana, foram monitorados ao longo de 120 dias de operação dos reatores.

Esta etapa teve por objetivo, ainda, avaliar comparativamente a diversidade bacteriana e sua evolução ao longo do período operacional nos reatores, utilizando técnicas moleculares de PCR-DGGE.

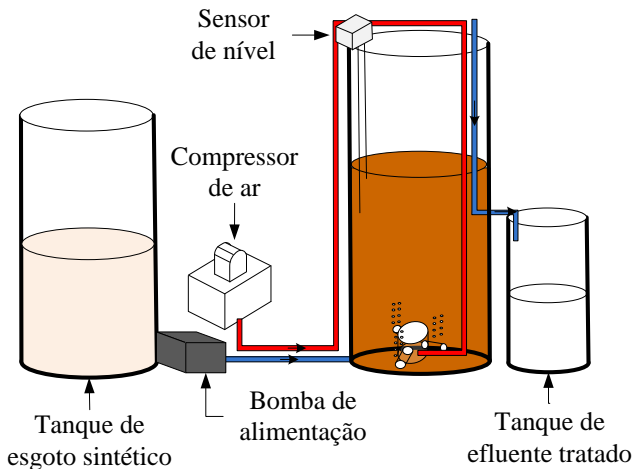
O reator MBR (Figura 3.4), utilizado nesta etapa, é o mesmo utilizado na etapa três, sendo que as condições operacionais se mantiveram idênticas. As modificações ocorreram na alimentação do sistema, onde o lodo da ETE1 foi substituído pelo lodo de um biorreator a membrana, híbrido de leito móvel (KELLNER, 2014). E a solução de esgoto sintético utilizada na etapa três (Tabela 3.2 seção 3.1.3) foi substituída por outra solução (Tabela 3.2 seção 3.1.3) com o intuito de aumentar a semelhança entre o esgoto utilizado e um esgoto real, sendo que a nova solução possuía acetato de sódio como fonte de carbono e tampão, e uma maior concentração dos compostos contendo nitrogênio e fósforo.

As modificações foram necessárias, pois se constatou que o lodo proveniente da ETE1 não estava sendo efetivo na realização dos processos de nitrificação e desnitrificação. Sendo que o lodo do reator de leito móvel apresentou remoção satisfatória de nitrogênio e já estava adaptado às condições utilizadas em biorreatores a membranas.

As características do esgoto sintético e as eficiências de remoção de EE2 e dos compostos nitrogenados não foram satisfatórias nos ensaios realizados na etapa três deste trabalho. Apesar de o esgoto sintético (Tabela 3.2 seção 3.1.3), usado na etapa três, ter se mostrado apropriado para estudos de remoção de estrogênios em biorreatores a membrana no estudo realizado por Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011).

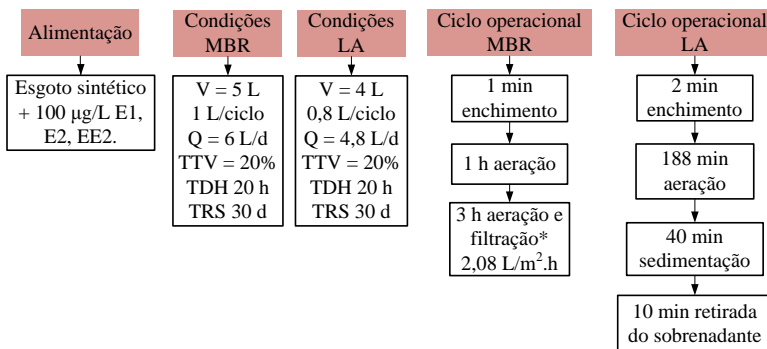
Além da operação do MBR, esta etapa contempla ainda, a operação de um reator de lodos ativados apresentado na Figura 3.5. Este reator é composto por um tanque de reação e um tanque de armazenamento ambos com capacidade de 7 L, e um tanque de coleta de sobrenadante com capacidade de 5 L. O fornecimento de oxigênio ao reator LA foi promovido por um soprador de ar (Thomas LP-120H) conectado a difusores instalados no interior do reator. Todas as etapas de tratamento foram controladas de forma automática através do painel de controle. A retirada do sobrenadante foi realizada por uma bomba de sucção, através de um cano de PVC com furos de 0,47 mm de diâmetro. Este sistema impediu a retirada de sólidos juntamente com o sobrenadante.

Figura 3.5 – Representação esquemática do sistema piloto de lodos ativados (LA).



Os dois sistemas foram instalados em uma sala com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e operados simultaneamente sob as condições operacionais apresentadas na Figura 3.6, sendo que TRS e TDH foram mantidos em 30 d e 20 h, respectivamente, para ambos os reatores. O TRS foi mantido através da retirada diária de 166 e 130 mL de lodo dos reatores MBR e LA, respectivamente, sendo este volume calculado pelo balanço de massa do sistema.

Figura 3.6 – Condições operacionais dos reatores: biorreator a membrana (MBR) e lodos ativados (LA).



*9 min de filtração e 1 min de relaxamento.

Os reatores foram alimentados com esgoto sintético (Tabela 3.2). Para monitoramento do sistema, foram realizadas análises quantitativas dos hormônios e demais parâmetros de qualidade, conforme Tabela 3.7, com frequência de duas vezes por semana, totalizando 30 dias de coleta e monitoramento ao longo dos 120 dias de operação dos reatores. Os diferentes pontos de amostragem em cada reator foram identificados da seguinte maneira:

- Entrada – amostra de esgoto sintético;
- Saída MBR – permeado ao reator MBR;
- Saída LA – sobrenadante ao reator LA;
- MBR 5L – amostra retirada do interior do reator MBR, 5 min após o enchimento, volume máximo de 5 L;
- LA 4L – amostra retirada do interior do reator LA, 5 min após o enchimento, volume máximo de 4 L;
- MBR 4L – amostra retirada do interior do reator MBR após 3 h de reação, quando o reator atinge seu volume mínimo de 4 L.

Para avaliar comparativamente o comportamento do lodo em diferentes sistemas, foram realizadas análises diretamente na biomassa contida no interior dos reatores, como respirometria, microscopia, granulometria e análises moleculares.

Tabela 3.7 – Parâmetros monitorados em seis pontos de coleta dos reatores.

Ponto de coleta nos reatores	Variável de interesse
Entrada	pH, DQO, COD*, N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₂ ⁻ , N-NO ₃ ⁻ , P-PO ₄ ³⁻ , E1, E2, EE2
Saída MBR	
Saída LA	
MBR 5L	
LA 4L	
MBR 4L	
MBR 5L	SST, SSV, IVL,
LA 4L	OD, Temperatura
Entrada	Turbidez
Saída MBR	
Saída LA	

*COD – Carbono orgânico dissolvido

3.3 TÉCNICAS DE ANÁLISE

3.3.1 Caracterização físico-química

As análises para a caracterização físico-química e monitoramento das amostras retiradas dos reatores, durante as etapas 3 e 4, foram realizadas conforme metodologia indicada no Standard Methods (APHA, 2005). Os métodos e equipamentos utilizados estão apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Análises, métodos analíticos e equipamentos utilizados para a caracterização das amostras.

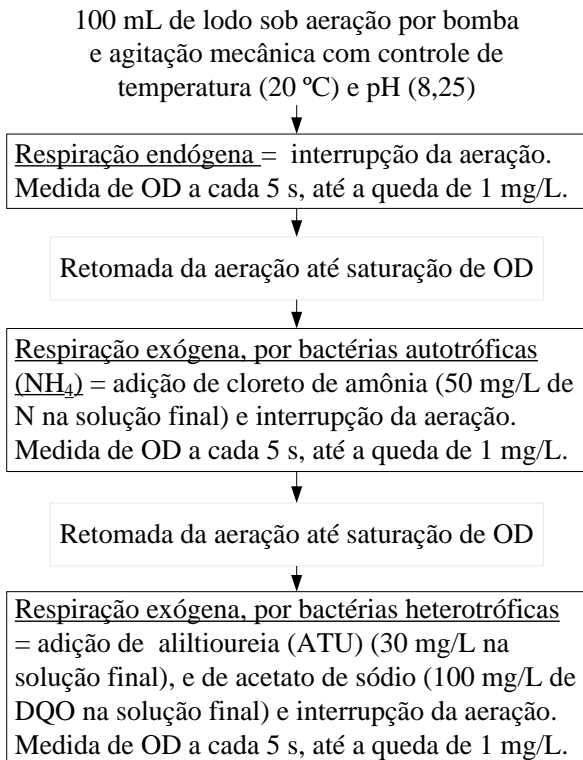
Análises	Métodos e equipamentos
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Método colorimétrico de refluxo fechado, Kit Hach e espectrofotômetro Hach modelo DR/5000.
Amônia	Método de Nessler com kit Hach, espectrofotômetro Hach modelo DR/5000.
Carbono orgânico dissolvido (COD)	Analizador de Carbono Orgânico Total (TOC) marca Shimadzu, modelo TOC-LCSH.
Nitrito, Nitrato e Fosfato	Cromatografia líquida de troca iônica, Cromatógrafo Dionex, modelo ICS 5000.
Sólidos suspensos	Método gravimétrico.
pH	Método potenciométrico, medidor de pH Thermo Scientific Orion 3 Stars.
Turbidez	Método Nefelométrico, turbidímetro Hach 2100P.
Índice volumétrico de lodo (IVL)	Sedimentação em proveta (VON SPERLING, 2012).
Temperatura e Oxigênio Dissolvido (OD)	Oxímetro portátil YSI-55.

3.3.2 Caracterização do lodo

Análises de respirometria foram executadas para verificação da taxa de consumo de oxigênios (TCO) por bactérias autotróficas (para oxidação de amônia e nitrito) e heterotróficas. As análises foram conduzidas seguindo o procedimento apresentado nas Figuras 3.7 e 3.8. Sendo a respiração endógena referente à energia requerida para

manutenção das células, sem adição de substrato. Os valores obtidos de OD (mg/L) em função do tempo (h) geram um gráfico, cujo coeficiente angular da reta representa a TCO.

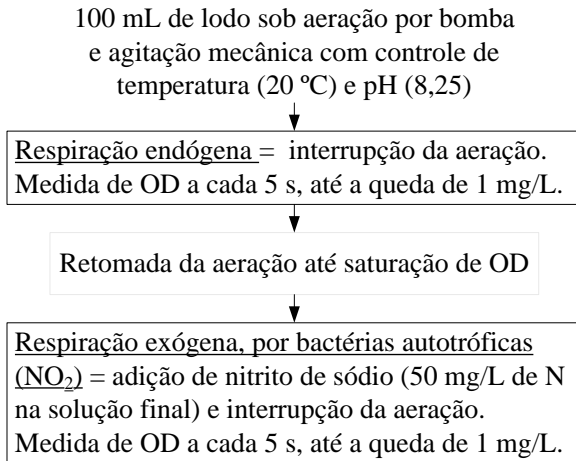
Figura 3.7 – Representação esquemática do procedimento para a obtenção da TOC por bactérias autotróficas (oxidação de amônia) e heterotróficas.



Análises microscópicas foram realizadas imediatamente após a coleta das amostras e preparação das lâminas, em um microscópio óptico da marca Olympus com aumento de 100 e 400 vezes.

Já as análises granulométricas foram realizadas a partir da coleta de aproximadamente 40 mL de amostra de lodo dos reatores na fase de aeração, e imediata análise em um granulômetro a laser Mastersizer 2000, pertencente ao Laboratório de Farmacotécnica do departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Figura 3.8 – Representação esquemática do procedimento para a obtenção da TOC por bactérias autotróficas (oxidação de nitrito).



3.3.3 Determinação de hormônios

As análises para determinação da concentração de hormônios foram realizadas no laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Técnicas Avançadas para o Tratamento de Resíduos (TECNOTRATER), do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.3.3.1 Procedimento de extração em fase sólida

Anteriormente a determinação dos hormônios, a amostra foi cuidadosamente preparada. A preparação consistiu-se na filtração da amostra em membrana de fibra de vidro com diâmetro de poro de 0,7 µm. Em seguida, o pH da amostra filtrada foi ajustado para 3,0 com solução de ácido clorídrico 6,0 mol/L. Na sequência, efetuou-se o procedimento de extração em fase sólida (SPE), sendo este procedimento necessário para concentrar os estrogênios e para retirar as impurezas presentes na amostra. Para realizar a extração, foi utilizada um cartucho de extração SampliQ, C-18 (ODS) 1000 mg x 6 mL, marca Agilent Technologies / USA.

O procedimento de extração em fase sólida é composto por várias etapas e, para adotar as condições mais adequadas de recuperação dos

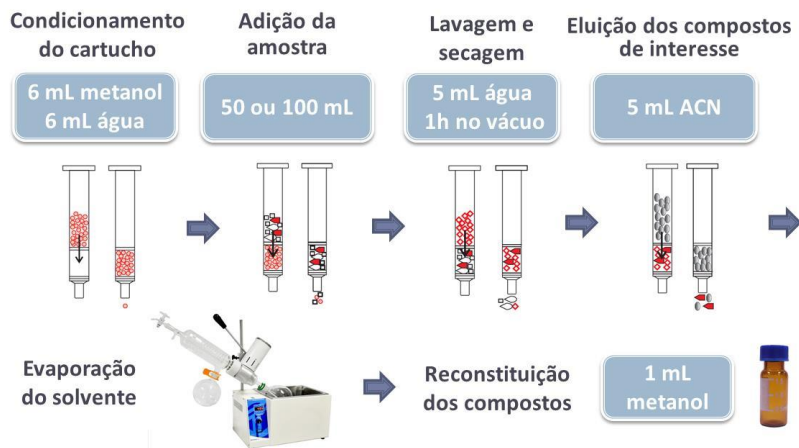
compostos em estudo, algumas adaptações e variações foram realizadas, baseando-se em estudos da literatura (RIBEIRO et al., 2007; MOREIRA et al., 2009; LOPES et al., 2010; VERBINNEN; NUNES; VIEIRA, 2010; MONTAGNER; JARDIM, 2011).

Para tanto, três condições foram testadas considerando o material da membrana a ser utilizado na filtração prévia da amostra (fibra de vidro 0,7 μm e acetato de celulose 0,45 μm); condicionamento do cartucho com mais um solvente (acetonitrila) além de metanol e água; e o procedimento de lavagem do cartucho com água após a passagem da amostra, o que não é sugerido por alguns estudos. Os testes foram realizados em água destilada fortificada com 8 $\mu\text{g/L}$ de cada um dos três hormônios.

Após o estabelecimento das melhores condições, o procedimento de extração foi estabelecido e utilizado em todos os ensaios, conforme Figura 3.9. A primeira etapa do procedimento de SPE correspondeu ao condicionamento do cartucho, obtido a partir da passagem de 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura (pH = 3,0). Em seguida, a amostra foi submetida a filtração no cartucho, em fluxo constante de 5 a 7 mL/min, em volumes que variaram de 50 a 200 mL, de acordo com a concentração dos analitos, inicialmente estimada para cada amostra. Os procedimentos de condicionamento do cartucho e a passagem da amostra foram realizados com o auxílio de um sistema manifold (Waters) e uma bomba à vácuo (Primatec). Após esta etapa, 5 mL de água ultrapura foram adicionados para remoção de impurezas e o cartucho permaneceu por 1 h sob vácuo para secagem. Os analitos foram eluídos com 5 mL de acetonitrila. O volume obtido foi submetido ao processo de evaporação do solvente em evaporador rotativo a uma temperatura inferior a 60 °C. Finalmente, o extrato foi reconstituído pela adição de 1 mL de metanol, sendo que um ultrassom auxiliou o processo de reconstituição.

Após o procedimento de extração, os extratos foram armazenados a -20 °C por no máximo 15 dias e levados para análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

Figura 3.9 – Representação esquemática do procedimento de extração em fase sólida (SPE).



3.3.3.2 Condições cromatográficas experimentais

Análises por HPLC foram realizadas utilizando um cromatógrafo Varian, modelo 920 LC, com um detector de arranjo de diodos (DAD), uma coluna de sílica C18 de 5 μm e 250 x 4,6 mm, uma pré coluna C8 ambas da marca microsorb-MV100-5 e um software GALAXIE v 1.9. As condições cromatográficas, otimizadas e estabelecidas por Liz (2013), para determinar as concentrações dos estrogênios em solução aquosa, foram as seguintes: fluxo = 0,8 mL/min, volume de injeção = 50 μL ; detecção = 197 nm; temperatura da coluna = 30 ± 2 °C e um sistema de eluição por gradiente com acetonitrila (ACN) e água (H_2O) como solventes. As proporções de solvente foram variadas como segue: condição inicial de H_2O :ACN a 90:10, sendo esta proporção linearmente alterada para 30:70 durante 26 min, em seguida a proporção de H_2O foi reduzida para zero ao longo de 5 min, e esta condição foi mantida por 6 min (limpeza da coluna), sendo que a proporção H_2O :ACN foi linearmente retomada para 90:10 durante 3 min e depois permanece a 90:10 por 7 min (equilíbrio da coluna).

3.3.3.3 Validação cromatográfica

A validação cromatográfica foi realizada utilizando solução aquosa composta por água ultrapura e os compostos de interesse

dissolvidos em metanol. Os parâmetros analíticos avaliados incluem seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Através da injeção de amostras contendo apenas metanol e de soluções puras contendo apenas um dos hormônios, na concentração de 2,5 mg/L, foi possível avaliar a seletividade do método pelo tempo de retenção de cada composto. A linearidade foi avaliada através da preparação, em triplicata, e injeção de duas curvas analíticas, contendo os três hormônios dissolvidos em metanol, em intervalos de 50-500 mg/L e de 200-5000 mg/L.

A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação, realizados em triplicata para três níveis de concentração diferentes, baixo (0,5 µg/L), médio (10 µg/L) e alto (80 µg/L), com valores aceitáveis de 70 - 120%, estabelecidos pela Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999). A precisão do método foi calculada utilizando o coeficiente de variação dos valores obtidos a partir dos ensaios de recuperação citados acima, e a precisão instrumental foi obtida através da injeção de um mesmo ponto da curva por três vezes consecutivas. Os compostos foram quantificados por calibração externa.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos a partir da curva analítica através das equações 3.1 e 3.2. Ressalta-se que os valores obtidos não levam em consideração o efeito matriz.

$$LD = 3,3 \times DP/S \quad \text{Equação 3.1}$$

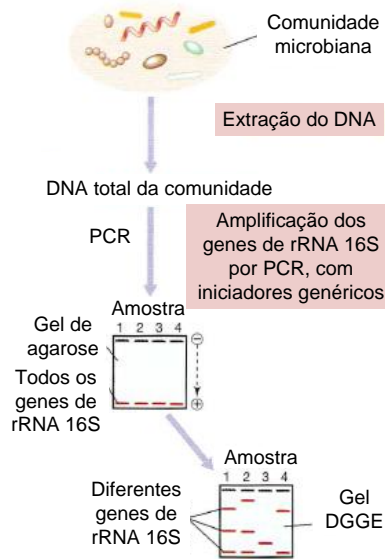
$$LQ = 10 \times DP/S \quad \text{Equação 3.2}$$

onde: DP é o desvio padrão do coeficiente linear; e S é a inclinação da curva analítica.

3.3.4 Análises moleculares

A diversidade da comunidade microbiana presente nos sistemas avaliados foi caracterizada pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). O procedimento para condução destas técnicas é apresentado na Figura 3.10 e descrito nos próximos subitens.

Figura 3.10 – Representação esquemática do procedimento para caracterização da diversidade da comunidade bacteriana.



3.3.4.1 Extração do DNA

Para a extração do ácido desoxiribonucléico (DNA), foi utilizado um kit comercial (kit power soil mobio laboratories INC), seguindo a metodologia recomendada pelo fabricante. A quantidade de DNA extraída foi medida espectrofotometricamente usando um Biospectrofotômetro (Eppendorf) e o DNA extraído foi armazenado a uma temperatura de - 20 °C, até a amplificação gênica.

O procedimento de extração é realizado fazendo uso de frascos e reagentes fornecidos no kit, e aproximadamente 0,25 g de amostra de lodo. Uma série de etapas de adição de reagentes, centrifugação, repouso e transferência para novos frascos são conduzidas com a finalidade de promover a lise das células, a quebra de moléculas de ácidos graxos e lipídios, e a precipitação de material orgânico e inorgânico, como substâncias húmicas, resíduos celulares e proteínas. Permitindo, desta forma, a obtenção de um DNA isolado com elevado grau de pureza.

3.3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi realizada fazendo-se uso dos iniciadores R1401 (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3') e F968 (5'-GC-Clamp [CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G]-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'), abrangendo a região aproximada entre os nucleotídeos 968 e 1401 do gene 16S rRNA, que inclui as regiões variáveis V6-V8 (EVANS et al., 2004; LI et al., 2006; PINHATI, 2008; WISZNIOWSKI et al., 2011), e dos reagentes e concentrações descritos na Tabela 3.9 (Technical Bulletin, Sigma-Aldrich, D4545).

Para a amplificação foi utilizado um termociclador (Mastercycler Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 3 min, 35 ciclos compostos por 94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min (aelamento); e 72 °C por 1 min (extensão), finalmente uma etapa a 72 °C por 10 min de extensão final é realizada (EVANS et al., 2004).

Tabela 3.9 – Reagentes necessários para a execução da técnica de PCR.

Reagentes	Concentração final
Buffer 10x	1x
Cloreto de magnésio 25 mM	2,5 mM
dNTPs 10 mM	0,2 mM
Iniciadores 20 µM	0,4 µM cada
Taq polimerase 5 U/µL	0,05 U/µL
DNA molde	200 pg/µL
Água ultrapura	Até 50 µl

A análise dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (2% p/v agarose) contendo gel red (10 µL para 100 mL de agarose), fazendo uso de 4 µL de corante (azul de azul de bromofenol, xilenocianol, glicerol e água) e 4 µL de produto de PCR, em tampão 1X TBE (Tris-borato-EDTA, pH 8,3). A corrida foi realizada a 60 V por 35 min, e a 100 V por uma hora e meia, a visualização foi conduzida sob luz ultravioleta (UV) em um transiluminador e registrada através de um sistema de captura de imagens (LPix Image STi).

3.3.4.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Na análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), fragmentos de DNA com o mesmo comprimento, mas com sequências diferentes, podem ser separados. A separação baseia-se na diminuição da mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA de cadeia dupla, parcialmente derretida em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear desnaturante de DNA (uma mistura de ureia e formamida). Moléculas de DNA com sequências diferentes param a migração em posições diferentes (LUXMY; NAKAJIMA; YAMAMOTO, 2000).

Para a realização da técnica de DGGE foi utilizado um sistema Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) e eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%.

A corrida da eletroforese foi realizada, diferentemente para cada tipo de amostra conforme Tabela 3.10, a 130 V e temperatura constante de 60 °C, em 7 L de tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X. O gel foi corado com solução comercial Gel Red em água ultrapura por 50 min, visualizado em luz UV e fotografado em um sistema de captura de imagens (LPix Image STi). As análises de Cluster, apresentadas como dendrogramas, foram obtidas através do software Gel Compar II versão 6.5.

Tabela 3.10 – Condições para a corrida do gel de DGGE.

Amostras	Gradiente (%)	Volume	Tempo de corrida
Ensaio cinéticos	25-60	Variável	4h30min
Reator de enriquecimento	35-60	10	4h35min
Reatores LA e MBR	35-60	20	5h25min

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

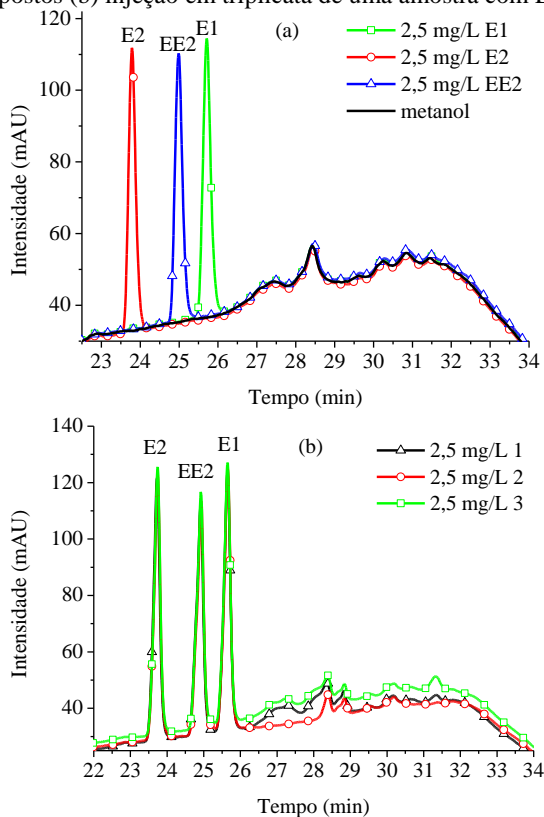
4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Diferentes condições referentes ao procedimento de extração em fase sólida (SPE) foram avaliadas, fazendo uso de 8,0 µg/L dos hormônios, com o intuito de garantir a melhor recuperação dos analitos. Todas as condições testadas apresentaram recuperação superior a 84% e inferior a 112%, sendo que a média foi de 92,4, 97,3, e 96,2% para 17β-estradiol (E2), 17α-etinilestradiol (EE2) e estrona (E1), respectivamente. Portanto, todas as condições testadas são adequadas para uso neste estudo, com base na recomendação de GARP (1999). Desta forma, o procedimento adotado fez uso de membrana de fibra de vidro para filtração das amostras, metanol e água para condicionamento do cartucho, e a lavagem do cartucho com água ultrapura, após a passagem da amostra.

A seletividade foi verificada através da injeção de amostras padrão, preparadas a partir da dissolução dos compostos em metanol. Os cromatogramas obtidos (Figura 4.1a) indicam picos distintos e bem definidos para cada composto. Na Figura 4.1b são apresentados os cromatogramas referentes as injeções para obtenção da precisão instrumental, observa-se que as sequências de injeções são reprodutíveis, em termos de tempo e intensidade, indicando boa precisão. Na Tabela 4.1 são apresentados os valores de linearidade, LD, LQ, exatidão, coeficiente de variação e precisão instrumental, sendo que estes parâmetros encontram-se dentro da faixa considerada aceitável pela literatura (RIBANI et al., 2004).

Os limites de detecção e quantificação apresentados na Tabela 4.1 são referentes as condições adotadas, considerando a curva de calibração e as limitações do equipamento. No entanto, as amostras foram concentradas durante a SPE, em que todo o volume inicial de amostra (50, 100 ou 200 mL) foi concentrado para um volume final único de 1 mL para injeção. Portanto, os valores de LD e LQ do equipamento, devem ser calculados considerando o fator de concentração e a porcentagem de recuperação de 102% para E2, 85% para EE2 e 87% para E1, gerando os valores apresentados na Tabela 4.2 para LQ.

Figura 4.1 – Cromatogramas (a) corrida individual de soluções contendo apenas um dos compostos (b) injeção em triplicata de uma amostra com E1, E2 e EE2.



Os limites de detecção e quantificação encontram-se próximos a valores verificados na literatura, onde a determinação dos compostos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores de arranjo de diodos (DAD) ou de fluorescência (FLU). Cordeiro et al. (2012), obtiveram limites de quantificação de 0,10 e 0,15 $\mu\text{g/L}$ para EE2 e E2, respectivamente, com detector FLU. Liz, Nagata e Zamora (2012), encontraram valores de limite de detecção de 9, 18 e 35 $\mu\text{g/L}$ para E1, E2 e EE2, respectivamente, fazendo uso de um detector

DAD. Verbinnen et al. (2010) alcançou um limite de detecção de 1,25 µg/L para os três compostos, também utilizando detector DAD.

Tabela 4.1 - Parâmetros de validação do método utilizado para analisar os estrogênios em diferentes concentrações de trabalho.

Composto	Coefficiente de correlação (r)	FLC (µg/L)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Exatidão (%) ^a	CV (%) ^a
E2	0,99907		9,6	32,0	102	11,6
EE2	0,99896	50-500	7,7	25,8	85	7,7
E1	0,99917		5,0	16,8	87	8,0
E2	0,9993		24,9	83,0		0,9 ^b
EE2	0,99878	200-5000	24,4	81,2		0,7 ^b
E1	0,99975		12,4	41,2		1,6 ^b

FLC = faixa linear de concentração; CV = coeficiente de variação;

LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação, ambos do equipamento;

^aMédia obtida para os três níveis de concentração (0,5, 10, e 80 µg/L);

^bPrecisão instrumental medida através do desvio padrão relativo (SRD) n = 3.

Tabela 4.2 – Valores dos limites de quantificação do método*.

Composto	FLC (µg/L)	Limite de quantificação (µg/L)			
		Fator de concentração			
		-	50x	100x	200x
E2		32,0	0,63	0,31	0,16
EE2	50-500	25,8	0,61	0,30	0,15
E1		16,8	0,39	0,19	0,10
E2		83,0	1,63	0,81	0,41
EE2	200-5000	81,2	1,91	0,96	0,48
E1		41,2	0,95	0,47	0,24

*Considerando o fator de concentração e a porcentagem de recuperação.

FLC = faixa linear de concentração.

Na Tabela 4.3 são apresentados os valores médios em porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo, referente a exatidão e precisão, respectivamente, obtidos após a realização do procedimento de extração em fase sólida, em triplicata, em amostras de água ultrapura fortificadas com concentrações conhecidas de hormônios.

Segundo a Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999), os valores aceitáveis de recuperação estão compreendidos entre 70 e 120%, e os valores aceitáveis de coeficiente de variação devem ser inferiores a 20%.

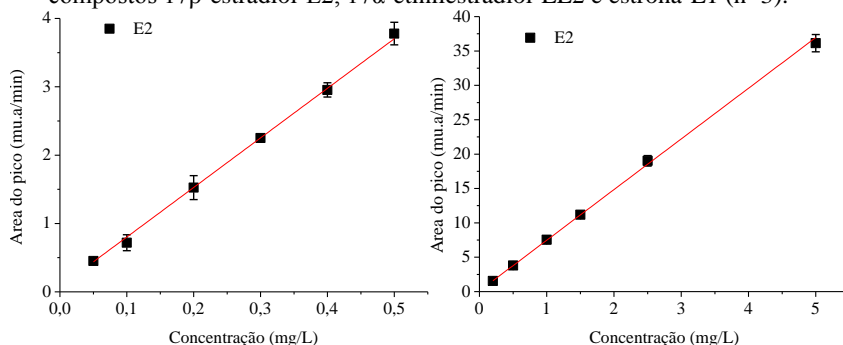
As duas curvas analíticas, preparadas em triplicata, são compostas por seis pontos de diferentes concentrações, entre 0,05 e 0,5 mg/L e 0,2 e 5,0 mg/L. Verificou-se que os resultados exibem excelente linearidade, como pode ser observado nos gráficos da Figura 4.2 e no cromatograma da Figura 4.3. A partir dos cromatogramas podem ser observados os tempos de retenção dos compostos, sendo estes de 23,8, 25,0 e 25,7 min para E2, EE2 e E1, respectivamente. As curvas obtidas apresentam coeficientes de correlação superior a 0,99, o que indica que a linha de regressão se ajusta bem aos dados (RIBANI et al., 2004).

Tabela 4.3 – Valores médios de exatidão e precisão.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Volume (mL)	Exatidão (%)			CV (%)		
		E2	EE2	E1	E2	EE2	E1
0,5	200	122	78	80	18,4	3,9	7,7
10	100	101	101	100	10,3	11,4	11,2
80	50	83	76	81	6,2	7,8	5,2

CV = coeficiente de variação.

Figura 4.2 – Curvas analíticas referente a determinação cromatográfica dos compostos 17 β -estradiol-E2, 17 α -etinilestradiol-EE2 e estrona-E1 (n=3).



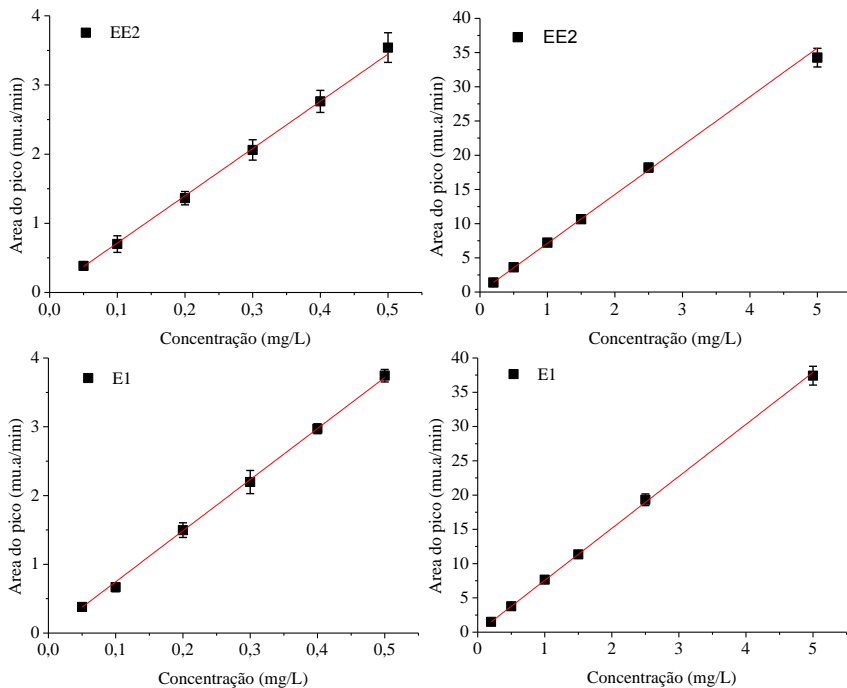
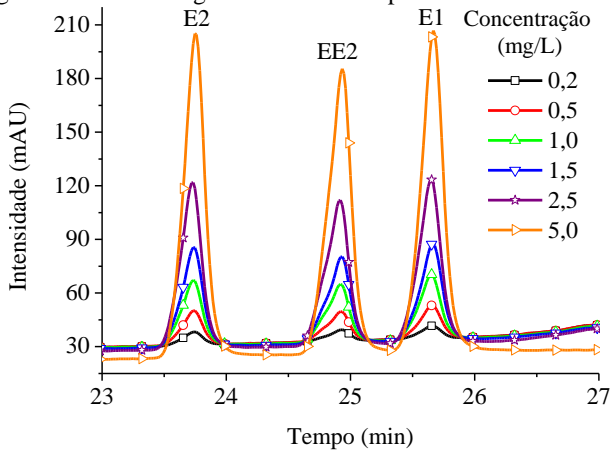


Figura 4.3 – Cromatograma referente os pontos da curva analítica.



A determinação de micropoluentes em amostras reais, como esgoto doméstico e efluente biológico, é mais complicada. Matrizes biológicas são susceptíveis a diversas interferências por apresentarem em sua composição diferentes substâncias desconhecidas. Tal fato torna a análise de um determinado composto bastante comprometida. Para minimizar este problema é recomendada a avaliação do efeito matriz.

4.2 ENSAIOS CINÉTICOS DE REMOÇÃO DE HORMÔNIOS (PRIMEIRA ETAPA)

4.2.1 Estudo dos fatores que afetam a remoção dos estrogênios

Os experimentos realizados para estudar a remoção dos estrogênios pelo lodo coletado na estação de tratamento de esgoto (ETE) foram conduzidos através de dez grupos de condições distintas, sendo que o primeiro utilizou o lodo inativado e os nove seguintes foram realizados com o lodo ativado (como mostra a Tabela 3.3). O ensaio 01 foi realizado para avaliar a habilidade de remoção dos estrogênios através do processo de sorção no lodo inativado, na ausência de bactérias. Os outros ensaios foram feitos para avaliar e comparar a influência de quatro fatores na biodegradação dos estrogênios, sendo: conteúdo de sólidos suspensos voláteis (SSV) (ensaios 02, 03 e 04); fornecimento ou ausência de micronutrientes no meio aquoso (ensaios 04, 05 e 06); concentração de metanol como fonte adicional de carbono (ensaios 06, 07 e 08 (sem metanol)); e origem dos lodos, sendo estes provenientes de diferentes sistemas de tratamento (ensaios 02, 09 e 10).

Os resultados obtidos na amostra identificada como branco, contendo apenas o esgoto sintético e os hormônios dissolvidos em metanol, na concentração de 100 µg/L e na ausência de lodo, apresentaram valores médios de concentração de 82,9 ± 5,4 µg/L para E2, 84,2 ± 4,3 µg/L para EE2, e 94,0 ± 4,3 µg/L para E1, durante todo o período de ensaio, para todos os tempos avaliados. Estes valores estão dentro da variação esperada, com relação à recuperação do procedimento de extração utilizado, indicando que nenhuma degradação é resultante da presença do meio sintético ou do metanol, nem da adsorção dos compostos na superfície dos reatores utilizados.

4.2.1.1 Efeito do tipo de lodo (ativado e inativado)

Para avaliar a contribuição do processo de adsorção na remoção dos estrogênios, um ensaio com lodo inativado foi conduzido (Tabela 3.3, ensaio 01 e Figura 4.4a). A concentração de EE2 diminuiu com o tempo (94,0% em 1 h) de maneira mais rápida do que as concentrações de E1 e E2. Este fato potencialmente resulta da maior hidrofobicidade do composto EE2 ($\text{Log}K_{ow} = 4,1$) quando comparado aos estrogênios naturais E1 e E2 ($\text{Log}K_{ow} = 3,1$ e $3,4$ para E1 e E2, respectivamente). Este resultado corrobora com os resultados dos estudos conduzidos por Uruse e Kikuta (2005), Ren et al. (2007a) e Zhang et al. (2012), em que 60,0% de EE2 foi removido durante os primeiros 20 min, 98,0% foi removido durante os primeiros 10 min e mais de 80,0% na primeira hora, respectivamente.

No mesmo ensaio com o lodo inativado, a concentração de E2 e E1 diminuiu aproximadamente 81,5 e 76,7%, respectivamente, em 24 h. Estes resultados conferem com aqueles obtidos por Ren et al. (2007a) (remoção de 93,6% para E2 e 98,0% para E1) e Shi et al. (2013) (60,0% de remoção de E1 em 8 h). Em contraste, a remoção de E2 foi maior do que a obtida por Li et al. (2005), tendo estes autores encontrado uma remoção máxima de E2 de 10,0% após 20 h usando 30 $\mu\text{g/L}$ de E2 e SSV de 1750 mg/L .

As características sorventes específicas do lodo e as condições experimentais, largamente afetam os resultados de remoção de estrogênios, conforme também observado por Chen e Hu (2010), Racz e Goel (2010) e Silva, Otero e Esteves (2012). Esta observação pode explicar a variabilidade dos resultados de sorção encontrada em diferentes estudos.

A quantidade de estrogênio em equilíbrio adsorvida no lodo inativado (q , $\mu\text{g/g}$ SSV) pode ser calculada através da equação 4.1 (REN et al., 2007a). Usando esta equação, foram obtidos os valores de 21,6, 23,7 e 27,4 $\mu\text{g/g}$ para E2, E1 e EE2, respectivamente (Tabela 4.4). Estes resultados confirmam que o hormônio sintético é adsorvido em maior quantidade do que os outros estrogênios durante as primeiras 24 h. Esta tendência também foi observada por Ren et al. (2007a).

$$q = (C_0 - C_e) V M^{-1} \quad \text{Equação 4.1}$$

onde: C_e é a concentração de estrogênio em equilíbrio na fase aquosa, $\mu\text{g/L}$; C_0 é a concentração inicial de estrogênio na solução, $\mu\text{g/L}$; V é o volume da solução, L ; e M é a massa do lodo, g SSV.

Tabela 4.4 – Parâmetros de adsorção para calcular a concentração de estrogênio no lodo inativado.

	E2	E1	EE2
C_0 ($\mu\text{g/L}$)	82,9	94,0	84,2
C_e ($\mu\text{g/L}$)	36,0	38,0	5,0
Tempo (h)	24	24	24
M (mg)	2250	2250	2250
V (mL)	750	750	750
q ($\mu\text{g/g VSS}$)	21,6	23,7	27,4

Para avaliar o comportamento dos estrogênios na presença do lodo inativado e do lodo ativado, os ensaios 01 e 02 foram comparados. No ensaio 02, realizado com lodo ativado (Figura 4.4b), E2 e E1 não foram mais detectados após 4 e 8 h, respectivamente. Entretanto, o hormônio sintético, EE2, foi observado mesmo após 24 h de teste ($0,9 \mu\text{g/L}$), apesar de sua elevada remoção (99,0%). Este resultado difere dos resultados obtidos por Ternes et al. (1999). Estes autores avaliaram a degradação do estrogênio em condições aeróbias e concentrações iniciais de 1000 e $1,0 \mu\text{g/L}$, e observaram uma diminuição de apenas 20,0% na concentração de EE2 após 48 e 24 h, respectivamente.

A remoção de hormônios do esgoto, em sistemas de lodos ativados, envolve, principalmente, os processos de adsorção e degradação (RACZ; GOEL, 2010; SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012). Geralmente, após uma rápida adsorção no lodo, a biodegradação reduz o nível de estrogênios nas fases aquosa e sólida (DESMIARTI; LI, 2013; MARTI; BATISTA, 2014). De acordo com Racz e Goel (2010), a perda imediata do composto no lodo ativado, que ocorreu neste estudo, pode ser atribuída ao processo de adsorção.

A eficiência de remoção de E1 e E2 foram maiores no ensaio 02 com o lodo ativado do que no ensaio 01 com o lodo inativado (Figura 4.4). Este resultado pode indicar a existência de mecanismos de

degradação por bactérias, que provavelmente coexistem com o mecanismo de adsorção no caso dos estrogênios naturais. Por outro lado, a remoção de EE2 foi mais lenta com o lodo ativado do que com o lodo inativado. Este fato sugere que a comunidade bacteriana teve maior dificuldade em degradar o estrogênio sintético EE2. Portanto, o primeiro mecanismo envolvido na remoção de EE2 foi a adsorção no lodo, seguida pela biodegradação.

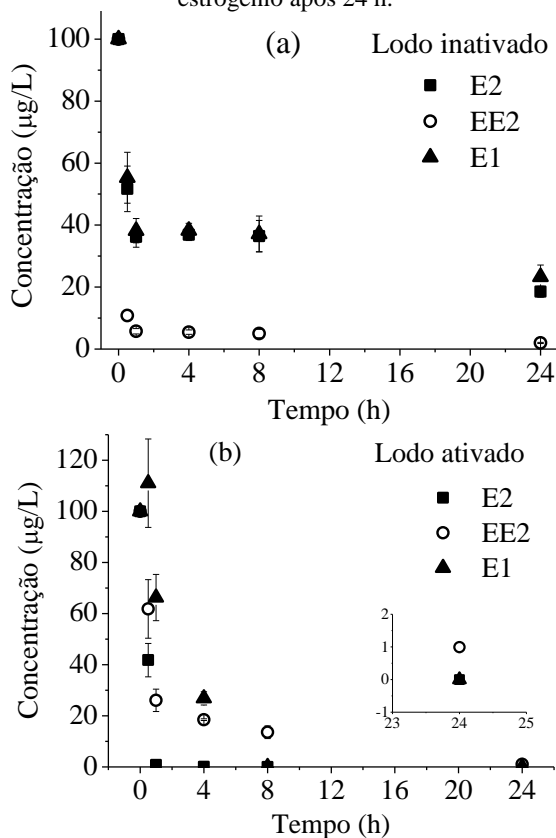
Quando os microrganismos estavam presentes, o efeito combinado dos processos de adsorção e degradação foi observado, principalmente, para os hormônios naturais, onde este efeito foi mais pronunciado e ocorreram simultaneamente. Entretanto, a remoção de EE2 foi mais lenta devido a maior afinidade dos microrganismos com os compostos E1 e E2 do que com o EE2. Entretanto, após 24 h, a remoção de EE2 foi maior quando o lodo ativado foi utilizado, confirmando a ocorrência dos processos de biodegradação e adsorção. Desta forma, postula-se que as bactérias começam a degradar EE2 quando a quantidade de hormônios facilmente assimiláveis estiver baixa. Este fato também se relaciona com o decaimento da DQO, ou seja, a degradação de EE2 é maior quando a relação A/M for menor.

A alta remoção de EE2 obtida com o lodo inativado pode ser explicada considerando vários aspectos. De acordo com Yi e Harper (2007b), mudanças nas partículas da biomassa (por exemplo, porosidade, densidade, área superficial disponível, e o conteúdo de proteínas e carboidratos presente nos flocos) afetam o K_d (coeficiente de sorção). Desta maneira, os autores concluíram que estes fatores podem afetar, diretamente, a forma pela qual o processo de adsorção é conduzido.

Além disso, o processo de inativação foi conduzido em autoclave, que potencialmente modifica as propriedades físicas dos flocos do lodo e pode significativamente afetar sua capacidade de sorção. No estudo realizado por Bougrier, Delgenès e Carrère (2008), as mudanças nas características de cinco diferentes amostras de lodo ativado foram avaliadas após tratamento térmico entre 90 e 210 °C. Os autores observaram que a concentração de partículas sólidas diminuiu e uma maior quantidade de partículas minerais permanece. Sólidos, proteínas, carboidratos e lipídeos foram solubilizados e mudanças em suas concentrações foram observadas. O tratamento por aquecimento

promove mudanças nas características físicas do lodo, como viscosidade, sedimentabilidade e filtrabilidade.

Figura 4.4 – Remoção de estrogênicos com (a) lodo ativado e (b) lodo inativado (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP). Inserção: concentração de estrogênio após 24 h.



Para aplicação desta pesquisa em um reator de fluxo contínuo, os resultados e sugestões fornecidos por Dialynas e Diamadopoulou (2012) devem ser considerados. A quantidade de cada composto que foi removido por adsorção, é resultante de sua adsorção na biomassa recém-crescida, que foi igual à quantidade descartada por dia para manter

constante o nível de sólidos suspensos dentro do reator. Entretanto, é necessária a realização de novas pesquisas para garantir que o lodo, removido de sistemas de tratamento de esgoto, com compostos adsorvidos será adequadamente tratado.

Os ensaios de 02 a 10, conduzidos com o lodo ativado, apresentaram uma redução na concentração de estrogênios em, no mínimo, 65,0% em todas as condições avaliadas dentro do período total de ensaio de 24 h. Em todos os nove ensaios, a concentração de E2 diminui significativamente durante os primeiros minutos de teste e sofreu uma redução superior a 98,5% em 1 h de teste. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Chang et al. (2006), em que uma remoção de 50,0% de E2 foi obtida após apenas 30 min de ensaio, e este composto não foi mais detectado após 10 h de ensaio em concentrações iniciais de 100 e 1000 µg/L. Similarmente, Desmiarti e Li (2013) observaram uma rápida degradação de E2, superior a 90,0%, após 30 min e total desaparecimento após 2 h ($LD = 0,01 \mu\text{g/L}$ para E2 e E1).

A alta habilidade do lodo ativado em degradar E2 pode ser atribuída a vários fatores, incluindo os processos de biodegradação e/ou sorção. Li et al. (2008) consideram que este estrogênio é fortemente adsorvido nas partículas do lodo ativado, enquanto outros autores indicam que E2 é rapidamente oxidado para E1 (JOSS et al., 2004; COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010; DESMIARTI; LI, 2013).

4.2.1.2 Impacto do conteúdo de sólidos suspensos voláteis

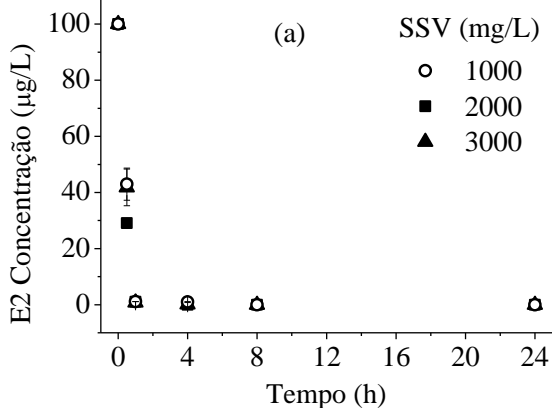
O tratamento de E2 pelo lodo ativado (ensaios 02, 03 e 04, Tabela 3.3) foi muito eficiente, com remoção superior a 50,0 e 98,5% após 30 min e 1 h, respectivamente, para os três conteúdos de SSV avaliados (1000, 2000, e 3000 mg/L) (Figura 4.5a). De acordo com Chen e Hu (2009) e Li et al. (2005), a degradação de E2 aumenta com o aumento da concentração de SSV, mesmo se a concentração máxima de E2 for significativamente menor do que a concentração de compostos orgânicos presentes no esgoto. Isto ocorre, pois a presença de maior quantidade de microrganismos no lodo ativado pode resultar em uma degradação mais efetiva de E2. Neste estudo, a remoção de E2 foi muito rápida, mesmo quando a menor concentração de SSV foi utilizada

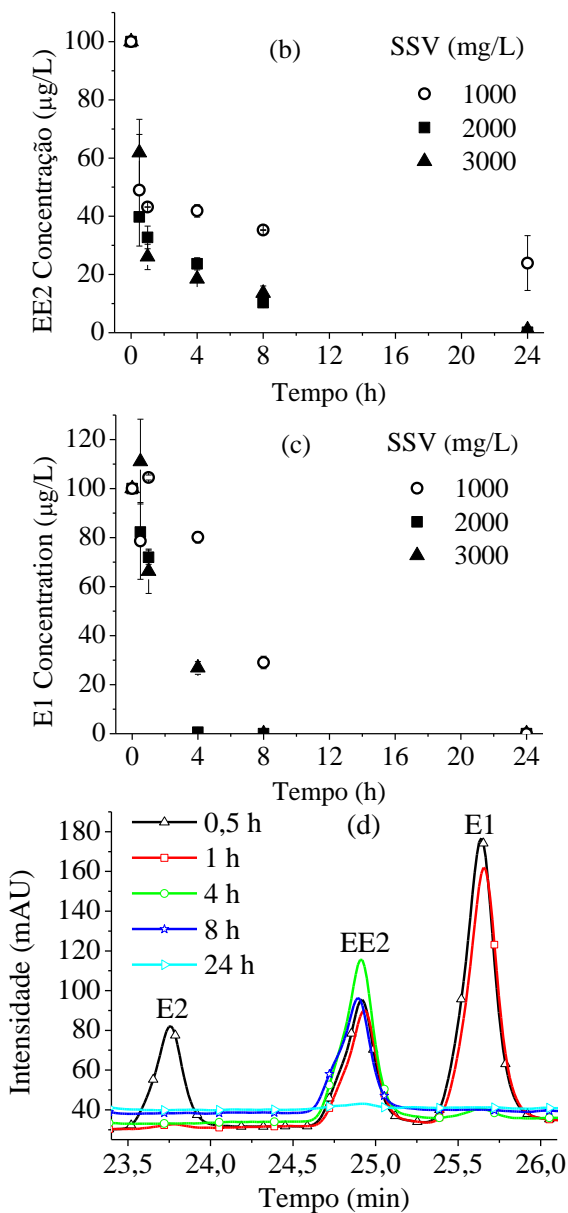
(Figura 4.5a). Este resultado sugere que alguns processos estão envolvidos na remoção de E2 como a degradação bacteriana e a adsorção (como discutido acima).

No ensaio realizado com 1000 mg/L de SSV, a concentração de E1 aumenta após 1 h de teste, provavelmente devido a oxidação de E2 para E1 (Figura 4.5b). O baixo conteúdo de SSV no sistema potencialmente contribuiu para a lenta degradação de E1. Este baixo conteúdo de SSV também não foi favorável para a degradação de EE2 (Figura 4.5c). Assim, apenas 76,0% de EE2 foram removidos após 24 h. O melhor resultado foi obtido com as maiores concentrações de SSV (2000 e 3000 mg/L), que potencialmente têm a maior população de bactérias e maior número de sítios de sorção.

Os cromatogramas referentes a determinação cromatográfica dos hormônios, com 2000 mg/L de SSV, são apresentados na Figura 4.5d. Verifica-se que o pico referente ao composto E2 é observado apenas no primeiro tempo de ensaio (0,5 h). O pico de E1 é bastante pronunciado nos tempos 0,5 e 1 h, e o composto EE2 apresenta pico bem definido até 8 h de ensaio. Em 24 h nenhum composto foi identificado com o método utilizado. A intensidade dos picos não é proporcional a concentração, pois o volume de amostra usada em cada tempo foi variado.

Figura 4.5 – Degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 em diferentes concentrações de SSV (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP), (d) Cromatograma da amostra com 2000 mg/L de SSV.





4.2.1.3 Influência das características do meio aquoso utilizado

Os ensaios 04, 05 e 06 (Tabela 3.3) foram conduzidos para comparar os efeitos de uma fonte natural de carbono (sobrenadante do lodo coletado na ETE1), uma fonte de macro e micronutrientes (meio sintético) e um meio com a ausência de fontes de carbono e macro e micronutrientes (água) na remoção dos estrogênios. A concentração inicial de amônia ($N-NH_4^+$) no esgoto sintético foi de 47,0 mg/L, e foi inferior a 0,2 mg/L no sobrenadante e na água.

Para E2, uma remoção elevada foi observada, tendo-se obtidos valores superiores a 98,5% já na primeira hora de ensaio. Conforme pode ser observado na Figura 4.6a, este comportamento foi verificado para os três meios avaliados, não sendo observada, portanto, influência da característica do meio no processo de remoção do hormônio.

Por outro lado, o uso do meio sintético resultou em uma maior degradação de EE2 (Figura 4.6b) e E1 (Figura 4.6c) em relação ao uso de água e sobrenadante, indicando que a presença de nutrientes, como amônia, acelera o processo de remoção de estrogênios. Alguns trabalhos observaram que a degradação de EE2 tem sido mediada pela atividade da amônia monooxigenase (AMO), uma enzima utilizada por bactérias oxidadoras de amônia (AOB) para catalisar a oxidação de amônia em nitrito (VADER et al., 2000; PHOLCHAN et al., 2008).

Assim, após 4 h, o composto E1 não foi mais detectado na presença do meio sintético. Entretanto, a remoção foi inferior a 60,0% neste mesmo período quando apenas água esteve presente no sistema. Dentro de 8 h, os valores obtidos na determinação de E1 foram menores do que o limite de quantificação do método para todos os meios testados. Com relação ao composto EE2, o efeito da amônia na degradação foi menos pronunciado, provavelmente devido a menor habilidade das bactérias em degradar o estrogênio sintético, porém também observado e uma alta remoção foi atingida após 8 h quando o meio sintético esteve presente. Após 24 h de teste, a remoção de EE2 foi superior a 89,0% em todos os meios avaliados, sendo superior a 99,0% na presença do meio sintético.

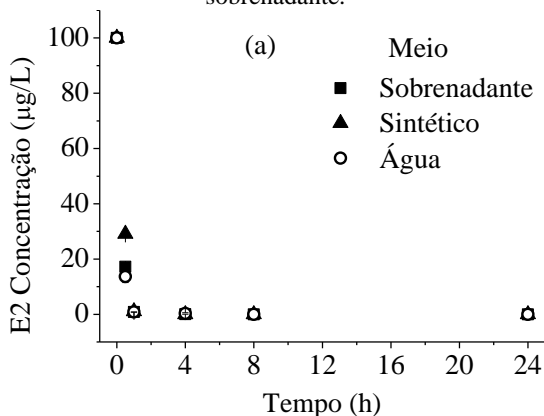
A presença de metanol nestes ensaios potencialmente favorece a alta remoção de estrogênios através do cometabolismo. Este processo é observado quando bactérias usam suas enzimas para degradar

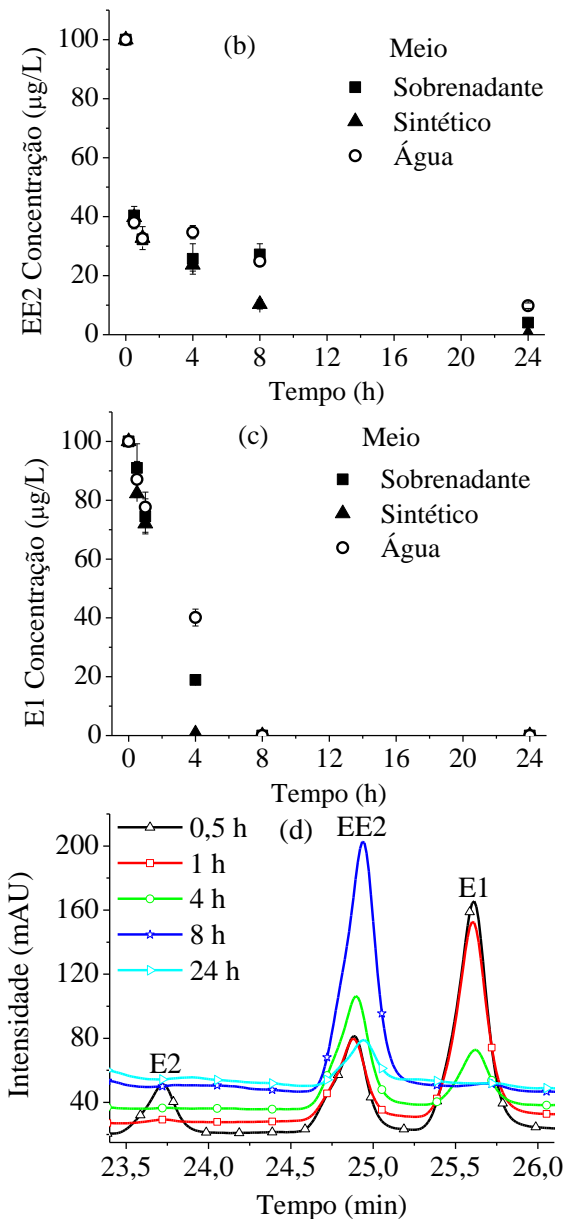
hormônios (HAMID; ESKICIOGLU, 2012; YU; RULA; KUNG-HUI, 2013). Entretanto, o efeito positivo da presença do metanol foi o mesmo nas três condições avaliadas, pois sua concentração foi mantida constante (750 mg/L) para possibilitar a comparação entre os diferentes meios.

Os cromatogramas, apresentados na Figura 4.6d, são referentes a amostra do sobrenadante como meio aquoso. É possível verificar uma rápida degradação de E2, pois o pico referente a este composto é observado apenas em 0,5 h, o pico de E1 é observado até 4 h de ensaio, e os picos de EE2 são bem definidos em todos os ensaios, comprovando a lenta degradação deste composto nestas condições.

Os diferentes meios avaliados consideravelmente afetam a habilidade dos microrganismos em remover estrogênios, principalmente devido à presença de nutrientes que são capazes de promover o crescimento e a manutenção microbiana. Deste modo, o melhor resultado foi obtido com o meio sintético, rico em amônia, seguido pelo sobrenadante. O uso de água como meio aquoso foi responsável pela menor remoção de estrogênios nas condições avaliadas.

Figura 4.6 – Degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 em diferentes meios aquosos (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP) (d) Cromatograma da amostra sobrenadante.





4.2.1.4 Influência da concentração de metanol

A influência da concentração de metanol, como fonte adicional de carbono, durante o tratamento por lodos ativados, foi avaliada através dos ensaios 06, 07 e 08 (Tabela 3.3). O metanol não foi tóxico para os microrganismos nas condições avaliadas, conforme observado em trabalhos anteriores (ESTRADA-ARRIAGA; MIJAYLOVA, 2011). O composto E2 foi rapidamente degradado, tendo-se obtido 78,0 - 97,0% de remoção de E2 durante os primeiros 30 min, nas três condições consideradas (Figura 4.7a).

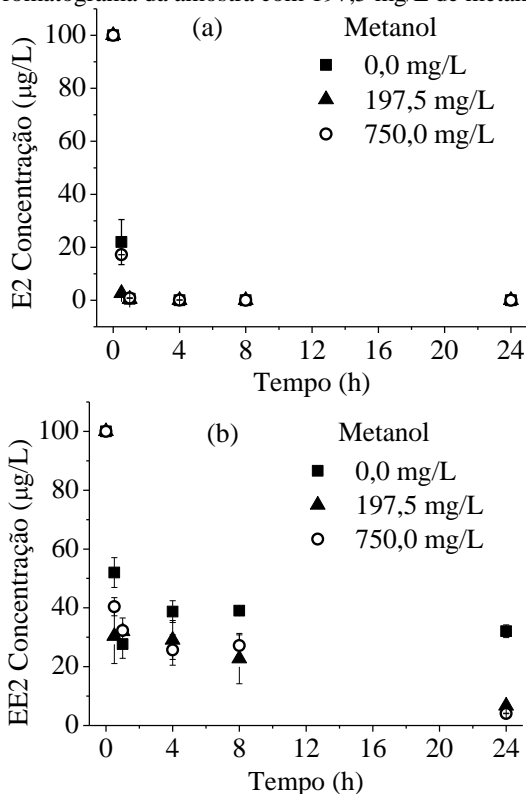
Os compostos E1 e EE2 foram removidos mais facilmente na presença da maior concentração de metanol utilizada (Figura 4.7). Deste modo, quando se utilizou 750 mg/L de metanol, a remoção de E1 foi superior a 80,0% em 4 h (Figura 4.7c). Entretanto, na ausência do metanol, uma remoção inferior a 45,0% ocorreu dentro de 4 h, sendo que entre 1 e 4 h de tratamento, não foi observada remoção do composto. Após 8 h, a remoção de E1 alcançou 82,0% na ausência de metanol, não sendo mais detectado nos ensaios com metanol.

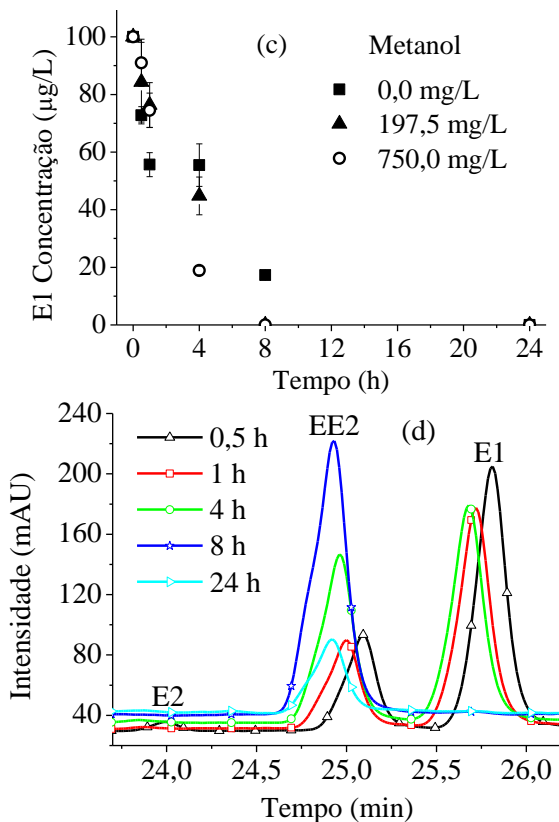
A remoção de EE2 não foi satisfatória quando o metanol não esteve presente em solução (Figura 4.7b). Estes resultados estão em contraste com o comportamento observado para E1 (Figura 4.7c), isto indica a menor habilidade da comunidade bacteriana em degradar o estrogênio sintético. Além disso, os testes foram conduzidos na presença do meio sobrenadante, onde a concentração de amônia foi inferior a 0,2 mg/L, ou seja, este resultado foi potencializado pela ausência de amônia que facilita a remoção do hormônio sintético por cometabolismo. Sendo assim, a máxima remoção de EE2 foi alcançada na presença de metanol, onde a probabilidade de ocorrer o processo de cometabolismo é maior, como sugerido por Larcher e Yargeau (2013).

Nos ensaios realizados por Muller et al. (2010) fazendo uso de culturas isoladas, os autores observaram que a presença de acetonitrila (ACN), um solvente orgânico como o metanol utilizado neste estudo, facilita a remoção de E1. Provavelmente, as bactérias que degradam E1 podem ter usado ACN, ou seus metabólitos, para obter o aumento em sua biomassa e acelerar a remoção de E1. Por outro lado, a remoção de EE2 foi inibida na presença de ACN, provavelmente, devido à competição por nutrientes entre as espécies que degradam ACN e EE2.

Nos cromatogramas apresentados na Figura 4.7d é possível verificar a presença dos picos para E1 nos três primeiros tempos (0,5; 1 e 4 h). Já o pico que representa E2 é visualizado apenas no primeiro ensaio, e o pico referente a EE2 pode ser observado em todos os tempos de ensaio para a amostra com 197,5 mg/L de metanol. Além disso, nos primeiros tempos de ensaios (0,5 e 1 h) o tempo de retenção foi deslocado devido à mudança de polaridade ocasionada pela maior concentração de metanol presente nestes períodos.

Figura 4.7 – Degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 em diferentes concentrações de metanol (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP) (d) Cromatograma da amostra com 197,5 mg/L de metanol.





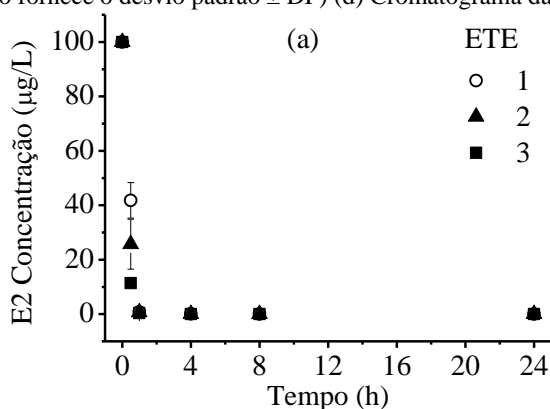
4.2.1.5 Efeito da origem do lodo

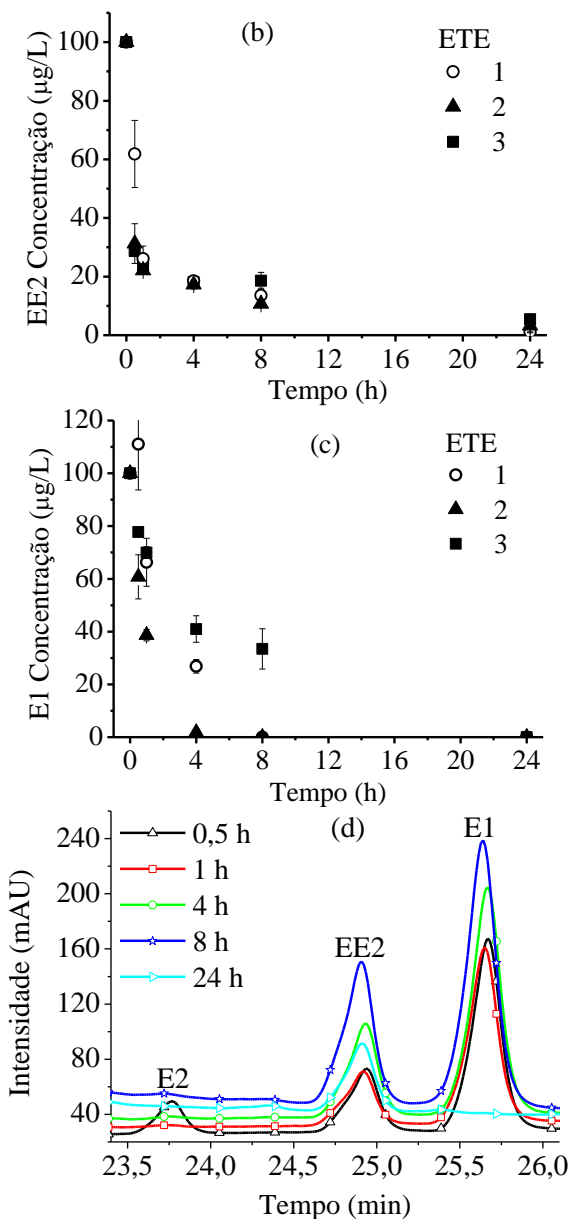
Os lodos utilizados foram amostrados nas ETEs cujos sistemas de tratamento são compostos por: ETE1 um seletor biológico e um sistema de lodos ativados operado na forma de aeração prolongada (SSV médio anual de 2534,0 mg/L); ETE2 lodos ativados operado na forma convencional como pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios tipo UASB (SSV médio anual de 4560,0 mg/L); e ETE3 lodos ativados operado na forma de batelada sequencial (SSV médio anual de 2500,0 mg/L).

A concentração de E2 (Figura 4.8a), em todos os lodos avaliados, foi reduzida bruscamente nos primeiros minutos de ensaio. Esse comportamento, segundo Li et al. (2008), ocorre devido a uma forte sorção deste composto nas partículas de lodo ativado. O composto que sofreu maior variação no decaimento da concentração ao longo do tempo, na comparação dos diferentes lodos, foi o E1 (Figura 4.8c). Observa-se que o lodo da ETE3, que opera com o sistema em batelada, é menos eficiente na remoção de E1 se comparado ao lodo das outras ETEs estudadas. Com relação ao composto EE2, a degradação apresentou comportamento semelhante para todos os lodos (Figura 4.8b), porém, mesmo após 24 h de ensaio, a presença deste composto ainda foi observada.

Na Figura 4.8d pode ser visualizado o perfil do cromatograma obtido durante a determinação da concentração dos hormônios por HPLC-DAD. Observa-se que os picos estão bem definidos, sendo que o pico do composto EE2 é visualizado em todos os tempos avaliados e o pico do composto E2 é observado apenas no tempo 0,5 h.

Figura 4.8 – Perfil de degradação de (a) E2, (b) EE2 e (c) E1 com lodo ativado proveniente de diferentes sistemas de tratamento (ETE1; ETE2; ETE3) (barra de erro fornece o desvio padrão \pm DP) (d) Cromatograma da ETE3.



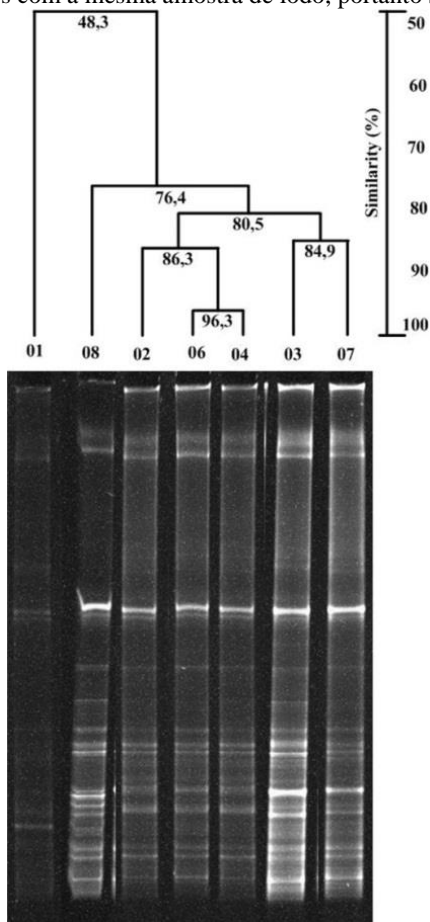


A ETE2 apresenta uma maior concentração de SSV no tanque de aeração, ou seja, existe uma maior quantidade de biomassa presente no sistema. Este fato, aliado a carga orgânica mais estabilizada devido ao pré-tratamento por UASB, podem ter contribuído com o bom resultado apresentado por este lodo na degradação dos compostos, principalmente com relação ao composto E1. O pior desempenho apresentado pelo lodo da ETE3 pode estar relacionado à presença da etapa de desnitrificação, composta por um período anóxico, que contribui para a baixa degradação do composto E1. Segundo Hashimoto e Murakami (2009), a degradação de estrogênios é mais lenta em condições anóxicas se comparada às condições aeróbias. Estes autores consideram que as condições aeróbias são favoráveis para uma efetiva remoção de estrogênios em ETEs.

4.2.2 Diversidade bacteriana do lodo

A comunidade bacteriana presente em cada amostra de lodo foi avaliada previamente aos ensaios da Tabela 3.3. As amostras foram coletadas no mesmo ponto na ETE1, porém em dias diferentes. Na Figura 4.9 são apresentadas as imagens obtidas através das análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e o dendrograma, que representa a análise de cluster. O resultado de similaridade das amostras de lodo ativado (Figura 4.9, amostras 02-08) indica que apenas pequenas mudanças ocorreram na diversidade bacteriana ao longo do tempo, as quais foram, provavelmente, promovidas por variações na qualidade do esgoto afluente a ETE, conforme sugerido por Miura et al. (2007) e Fernandes et al. (2013). Portanto, a diversidade bacteriana não muda consideravelmente em dias diferentes de amostragem. Deste modo, estes resultados indicam que a diversidade bacteriana não interfere nas variações, relacionadas a remoção de estrogênios, obtidas entre as amostras. As diferentes taxas de remoção de estrogênios obtidas neste estudo indicam que os principais fatores que afetam a habilidade da população microbiana em degradar hormônios são a concentração de SSV, o meio aquoso, e a concentração de metanol presentes no sistema avaliado, além da origem do lodo.

Figura 4.9 – Perfil de bandas do gel de DGGE da comunidade microbiana. Os números representam os ensaios da Tabela 3.3. Os ensaios 03 e 05 foram realizados com a mesma amostra de lodo, portanto são iguais.



A comparação da diversidade bacteriana presente nas amostras de lodo ativado (Figura 4.9, amostras 02-08) e lodo inativado (Figura 4.9, amostras 01) indica que a porcentagem de similaridade entre estas amostras foi inferior a 50,0% após o processo de inativação. Este processo modifica a diversidade bacteriana presente no lodo. As bandas

fracas presente na imagem do gel referente a amostra 01 (Figura 4.9) indicam que parte do material genético foi destruído.

Esta pesquisa mostra que os microrganismos se adaptam facilmente a presença dos estrogênios no meio. Os microrganismos podem crescer rapidamente e contribuir efetivamente com a degradação dos hormônios. Desta forma, é possível prever que bactérias capazes de degradar estrogênios estão presentes em sistemas convencionais de tratamento de esgoto, como lodos ativados. Este resultado também foi observado no estudo conduzido por Bagnall et al. (2012), em que a degradação dos estrogênios foi alcançada usando microrganismos não específicos em 24 h.

4.3 CULTIVO DE MICRORGANISMOS (SEGUNDA ETAPA)

A estratégia utilizada nesta etapa foi usar concentrações conhecidas dos compostos de interesse, E1, E2 e EE2, como principal fonte externa de carbono e energia, para selecionar bactérias, providas de sistemas enzimáticos com alta afinidade por estes compostos, e observar a degradação obtida.

4.3.1 Cultivo em reator de enriquecimento

O cultivo dos microrganismos, realizado em reator de enriquecimento, teve duração total de 105 dias, sendo que nos primeiros 70 dias, as etapas de abastecimento e descarte foram realizadas diariamente, conforme Tabela 3.4 (seção 3.2.2.1). A concentração de hormônios encontrada no efluente do reator, ao longo dos 70 dias de estudo e no dia 105, está apresentada na Figura 4.10. A partir da operação deste sistema, foi possível obter um consórcio de microrganismos com as características desejadas.

Após o enchimento do reator, foi calculada a concentração inicial dos compostos, sendo que os valores obtidos foram de 138,0 µg/L para cada um dos três compostos para os 16 primeiros dias, 183,0 µg/L para E1 e E2 e 78,0 µg/L para EE2, durante o segundo período (de 17 a 46 dias), e no último período (de 47 a 70 dias) a concentração de 183,0 µg/L de E1 e E2 foi mantida. Estes valores desconsideram a

concentração já existente dentro do reator após o primeiro abastecimento.

Desta forma a eficiência de remoção diária, calculada com base em dados experimentais, de E1 e E2 foi superior a 98,0% durante todo o período de funcionamento do reator (Figura 4.10). Estes compostos são rapidamente consumidos pelas bactérias, ao longo de todo o período operacional, principalmente nos últimos dias, quando a quantidade de biomassa já estava bastante reduzida. Desta forma, foi possível verificar que a seleção de bactérias degradadoras de hormônios naturais foi obtida. Além disso, a presença destes compostos é detectada em pequenas concentrações, sendo estas abaixo de 2,0 µg/L (Figura 4.10). Observa-se ainda, que do dia 16 ao dia 33 foi detectada apenas a presença do composto E2, mostrando que, apesar da oxidação de E2 para E1 ser provável, sugere-se que nem todo E2 presente no reator é convertido para E1 nas condições adotadas. Yoshimoto et al. (2004) observaram que a degradação de E2 não ocorreu via oxidação para E1, pois não foi verificada a presença de E1 durante a degradação de E2.

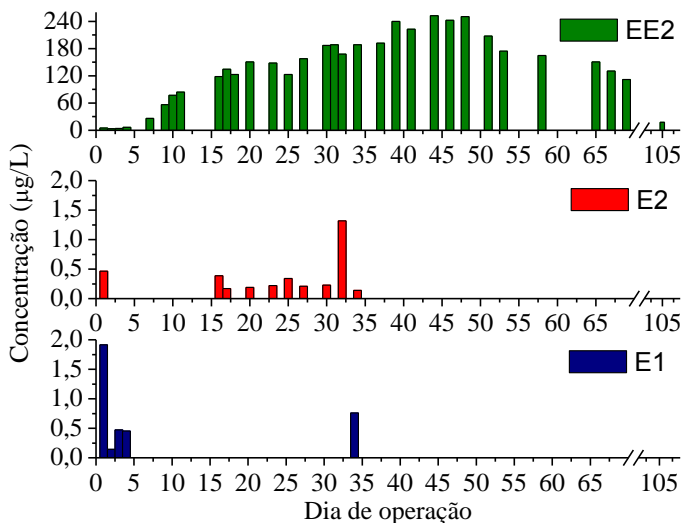
Por outro lado, é possível observar que, mesmo após a diminuição da concentração de EE2 na solução de abastecimento, o composto persiste no reator, apresentando um aumento gradativo em sua concentração, atingindo valores próximos a 250,0 µg/L entre os dias 44 e 48, e 130,0 µg/L no dia 70. Esta redução foi obtida através da diluição do líquido, presente no reator, com a solução de abastecimento desprovida de EE2 a partir do dia 47.

Durante os primeiros 70 dias as bactérias presentes no sistema não foram capazes de utilizar EE2 como fonte de carbono para crescimento. Provavelmente, a presença dos hormônios naturais favorece o uso destes compostos pelas bactérias e inibe o consumo de EE2, já que os compostos E1 e E2 são mais facilmente assimilados do que o hormônio sintético EE2. Desta forma, as bactérias optam por um caminho preferencial, onde a manutenção e a reprodução da espécie são obtidas com maior facilidade.

No estudo realizado por Pauwesi et al. (2008), a degradação foi iniciada a partir do grupo funcional mais acessível, presente nos estrogênios, tendo-se um grupo hidroxila no carbono 17 do composto E2 ou um grupo cetona no carbono 17 do composto E1. No caso do

composto EE2, o grupo hidroxila não está acessível devido ao impedimento estérico causado pelo grupo etinil.

Figura 4.10 – Concentração dos hormônios EE2, E2 e E1, presente no efluente do reator de enriquecimento ao longo do tempo*.



* Interrupção das etapas de alimentação e descarte no dia 71.

Concentração de entrada: 138,0 µg/L de E1, E2 e EE2 de 1 - 16 dias; 183,0 µg/L de E1 e E2 e 78,0 µg/L de EE2 de 17 a 46 dias; 183,0 µg/L de E1 e E2 de 47 a 70 dias.

Pauwesi et al. (2008) observaram que o composto EE2 não é utilizado pelos microrganismos como substrato para crescimento. Desta forma, sua remoção ocorre pelo processo de cometabolismo, após a degradação de E2 e formação de E1. O início da degradação tanto de E1 como de EE2 ocorreu ao mesmo tempo, depois de 112 h. Os autores sugerem que E1 age como um propulsor da degradação de EE2 durante o cometabolismo.

Neste estudo, o processo de cometabolismo pode ter sido iniciado, porém, devido, provavelmente ao fornecimento diário das três substâncias ao reator, sua ocorrência não foi perceptível. Desta forma, o sistema como um todo (bactérias e enzimas) não teve tempo suficiente

para degradar o composto E2, com formação de E1 e posterior cometabolismo de EE2. Um maior período para realização das etapas de abastecimento e retirada seria interessante para avaliar o comportamento do sistema após total degradação de E2.

Os resultados obtidos nesta etapa estão de acordo com o estudo realizado por Weber et al. (2005), onde uma cultura enriquecida a partir de uma amostra de lodo ativado, foi capaz de degradar E2 e E1, mas não foi eficiente na degradação de EE2, após seis subculturas repetidas.

Na literatura foram observados longos tempos, entre dois e sete dias, necessários à remoção dos hormônios naturais E1 e E2 (WEBER et al., 2005; YU; ROH; CHU, 2007; PAUWELS et al., 2008; ZENG et al., 2009; JIANG; YANG; CHEN, 2010; ZHOU et al., 2013). Desta forma, pode-se considerar que o consórcio de culturas obtido neste estudo apresenta alta capacidade de degradação destes compostos. Pois, foram verificadas remoções acima de 98,0% em apenas 24 h, já que o reator foi abastecido diariamente com solução provida de E1 e E2.

A partir do dia 71, o reator continuou em operação por mais 34 dias, porém, sem realizar as etapas de abastecimento e retirada. Durante este período o líquido contido no interior do reator permaneceu sob as mesmas condições anteriores (aeração, ausência de luz, 25 °C).

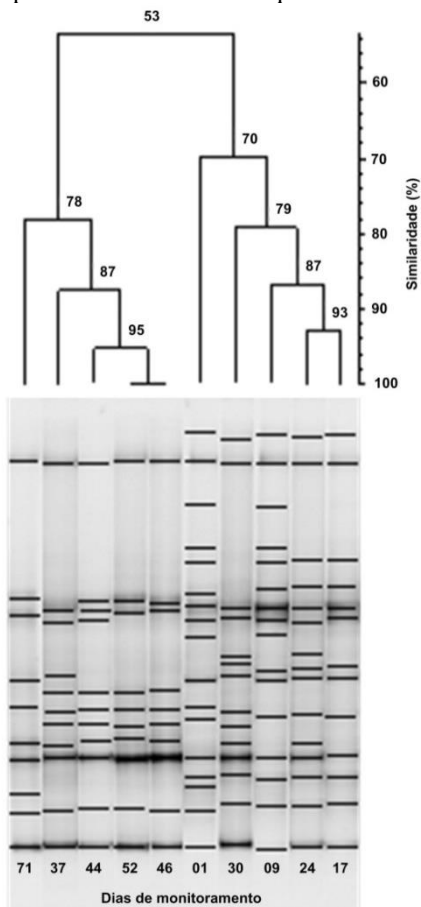
Após este período, uma amostra foi submetida à extração em fase sólida e análise de hormônios. Os resultados indicaram que as bactérias começam a usar o composto EE2 como fonte de carbono e energia, e a degradação de EE2 atingiu 87,5% em 34 dias na ausência de E1 e E2. Neste período não foi considerada a ocorrência do processo de cometabolismo, pois a única substância presente no reator, como fonte de carbono, foi o EE2.

O perfil da comunidade bacteriana, avaliado durante o período de funcionamento do reator, é mostrado na Figura 4.11. Observou-se que houve alterações na diversidade da comunidade, ao longo do tempo.

Por estes resultados, foi possível separar a semelhança, entre as comunidades de bactérias presentes no interior do reator, em dois grupos distintos, para o período de 70 dias, onde as etapas de abastecimento e retirada foram realizadas. O primeiro compreende os primeiros 30 dias, onde a comunidade é representada por um grande número de bandas. O segundo consiste nos próximos quarenta dias de monitoramento, este grupo mostrou menos bandas e a semelhança entre os dias é um pouco

maior. Portanto, estes resultados confirmam a seleção de bactérias capazes de degradar hormônios, principalmente os naturais (E1 e E2).

Figura 4.11 – Perfil de bandas do gel de DGGE da comunidade microbiana presente no reator de enriquecimento.



Observa-se ainda o desaparecimento de bandas que representam bactérias, provavelmente, incapazes de consumir hormônios como fonte de carbono e energia. A especiação levou a uma diminuição na

variedade de bactérias previamente existentes. Esta tendência também foi observada por Majone et al. (2006) na avaliação de um reator de enriquecimento em batelada sequencial.

4.3.2 Cultivo e seleção dos microrganismos em frações

Após o crescimento das culturas em diferentes condições por vários dias (Figura 3.3, seção 3.2.2.2), alíquotas das soluções obtidas, após a finalização do cultivo, foram usadas para avaliar a capacidade de degradação de hormônios em ensaios com 8 h de duração. As alíquotas foram identificadas como culturas 25 e 100, devido à quantidade originalmente utilizada para início do cultivo (2,5 e 10 mL). A concentração inicial adicionada foi de 100 µg/L dos hormônios naturais. Nos tempos 0, 1, 2, 4 e 8 h, uma amostra foi coletada e submetida ao procedimento adotado para determinação da concentração dos hormônios.

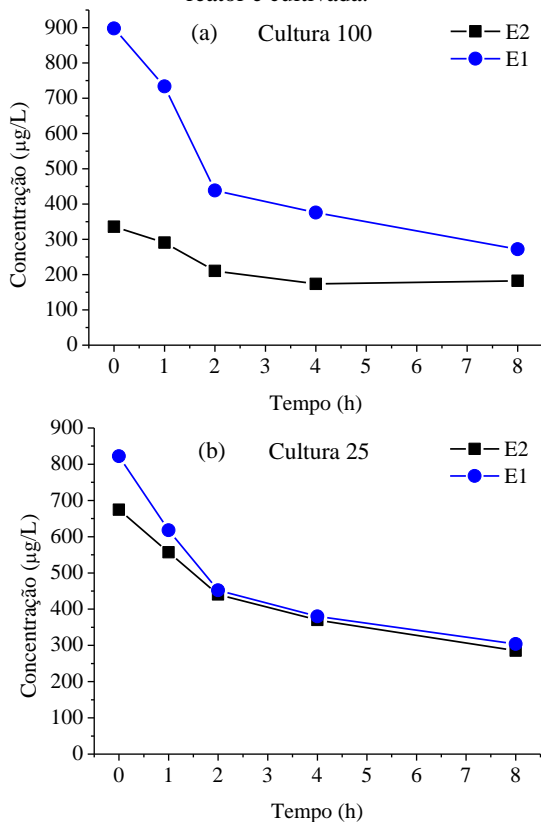
As culturas utilizadas nestes ensaios de degradação apresentaram altas concentrações iniciais dos hormônios naturais, devido à utilização destes compostos para o cultivo, sendo que os mesmos não foram totalmente consumidos e permaneceram em solução. Observou-se que, no período de cultivo, o consumo de E2 foi maior na cultura 100 do que na cultura 25, sendo que a quantidade de E2 ainda presente em solução, na cultura 25, foi maior do que o dobro do valor encontrado para a cultura 100, como pode ser observado no tempo 0 h apresentado na Figura 4.12. E1 foi consumido de forma semelhante por ambas as culturas, porém em proporção menor do que o composto E2.

Durante as 8 h de ensaio, a cultura 100 permitiu uma maior degradação de E1 do que de E2, 69,7 e 45,6%, respectivamente (Figura 4.12a). Por outro lado, a degradação de E1 e E2, dissolvidos inicialmente em metanol, pela cultura 25 foi bastante semelhante, sendo que a redução em suas concentrações apresentou a mesma tendência, com remoção de 57,7 e 63,0% para E2 e E1, respectivamente, conforme Figura 4.12b. Deve-se destacar que a degradação durante as 8 h foi rápida devido à condição de aeração intensa, que favoreceu tal resultado.

A quantidade de hormônios utilizada no cultivo não foi totalmente consumida, desta forma, uma porção das culturas 25 e 100 foi mantida a 25 °C sem aeração, em um erlenmeyer de 1 L, por mais

23 dias, para avaliar a possível degradação dos compostos utilizados durante o cultivo, E2 e E1. Os resultados obtidos mostram que os microrganismos utilizam os compostos para obtenção de energia e como fonte de carbono.

Figura 4.12 – Perfil de degradação de hormônios com a amostra retirada do reator e cultivada.



Neste período, observou-se que o composto mais consumido pelas bactérias, de ambas as culturas, para crescimento e manutenção, foi o E2, atingindo 74,0 e 87,0% de remoção, e valores de concentração final de 60,0 e 74,0 µg/L, para as culturas 100 e 25, respectivamente.

Por outro lado, o composto E1 permaneceu em solução em alta concentração (448,0 e 591,0 µg/L), sendo obtidos baixos valores de eficiência de remoção, inferior a 45,0 e 20,0%, para as culturas 100 e 25, respectivamente. Provavelmente, esse comportamento ocorreu devido ao processo de oxidação de E2 para E1, e pela baixa capacidade dos microrganismos em assimilar o composto E1.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os trabalhos de Yu, Roh e Chu (2007), Jiang, Yang e Chen (2010) e Li et al. (2012), onde excelentes resultados de degradação de E2 foram obtidos, embora a remoção de E1 tenha se mostrado mais lenta ou pouco eficiente.

Yu, Roh e Chu (2007) isolaram 14 bactérias em um biorreator originalmente inoculado com lodos ativados. Os autores observaram que todos os isolados foram eficientes na conversão de E2 para E1 dentro de sete dias (concentração inicial de 3,0 mg/L). Entretanto, apenas três isolados foram capazes de reduzir a concentração de E1 e apenas um isolado foi capaz de degradar completamente E1, sendo observado um aumento inicial em sua concentração, devido à transformação de E2. Após 24 h e 5 dias, E2 e E1 não foram mais detectados, respectivamente (LD = 5,0 µg/L).

Jiang, Yang e Chen (2010) isolaram 5 cepas de bactérias provenientes de uma amostra de lodo ativado. Todos os isolados foram capazes de degradar completamente uma alta concentração de E2 (1,0 mg/L) em 8 dias. Entretanto, o produto da degradação de E2, o composto E1, teve sua concentração reduzida em níveis próximos a 40,0 e 20,0% em apenas dois isolados em 9 dias.

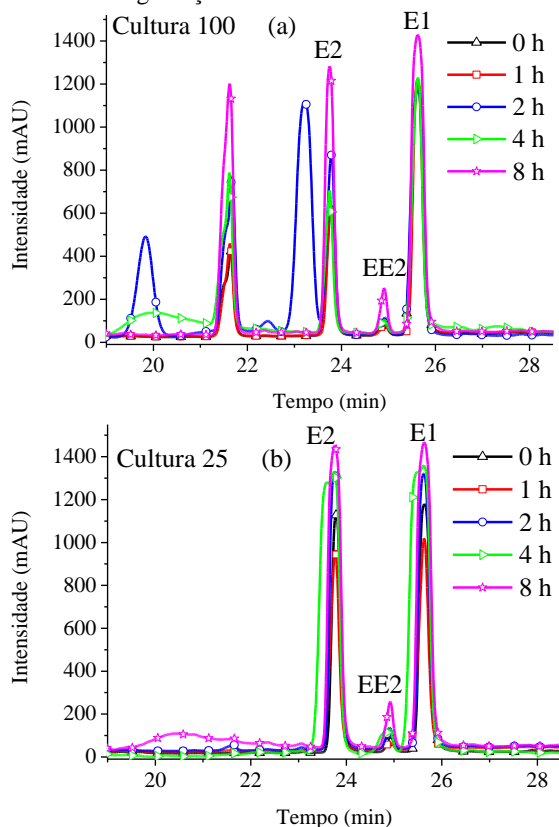
Li et al. (2012) obtiveram uma rápida degradação de E2 (3,3 mg/L), superior a 99,0% em apenas 16 h, utilizando a cepa isolada ZL1. Entretanto, a remoção de E1, produzido a partir da conversão de E2 para E1 (3,5 mg/L), teve sua concentração reduzida em apenas 50,0% após 104 h de tratamento.

Esta reduzida degradação de E1, durante a degradação de E2, é o fator limitante para a velocidade de conversão de E2 e E1 em metabólitos não estrogênicos ou produtos finais (YU; ROH; CHU, 2007; JIANG; YANG; CHEN, 2010).

A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 4.13, pode-se observar a formação de intermediários durante a degradação dos

compostos. Esta formação foi bastante pronunciada em 21,6 min em todos os tempos avaliados com a cultura 100 (Figura 4.13a). Além disso, depois de decorridas 2 h de ensaio, alguns compostos foram formados em 19,8, 22,4 e 23,2 min, representados pelos três picos identificados em azul na Figura 4.13a. Após 4 h, estes compostos não foram mais detectados. Já a cultura 25 não apresentou formação de intermediários (Figura 4.13b) nos tempos avaliados.

Figura 4.13 – Cromatogramas referentes a detecção de hormônios após o estudo de degradação com as culturas isoladas.



Chang et al. (2006) utilizaram a técnica de HPLC-FLU para quantificar os compostos E1 e E2. Estes autores também observaram a presença de picos não identificados, após a degradação de E2, em tempos menores do que o tempo de retenção do composto alvo. Segundo os autores, estes picos podem representar intermediários da biodegradação de E2 ou E1.

4.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO BIORREATOR A MEMBRANAS NA DEGRADAÇÃO DOS HORMÔNIOS (TERCEIRA ETAPA)

O reator MBR foi monitorado ao longo de 35 dias para verificar seu desempenho na remoção dos compostos de interesse, aplicando condições previamente estabelecidas tanto de alimentação (lodo da ETE1 e esgoto sintético, Tabela 3.2), quanto operacionais. Este monitoramento prévio foi necessário para verificar se as condições adotadas eram adequadas para garantir o bom funcionamento do sistema, pois o reator MBR foi desenvolvido para uso neste estudo e seu comportamento operacional ainda era desconhecido.

4.4.1 Avaliação do comportamento do sistema em relação às variáveis físico-químicas

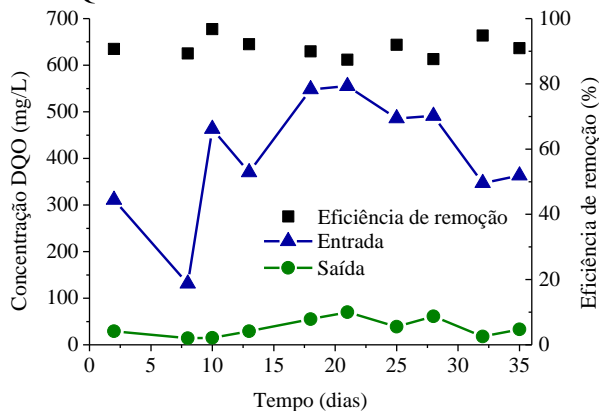
O esgoto sintético utilizado neste período foi preparado conforme composição adotada por Estrada-Arriga e Mijaylova (2011). Estes autores obtiveram alta eficiência de remoção de hormônios em um biorreator a membrana em escala laboratorial.

Nos primeiros dias de operação do reator MBR, observou-se valores médios de pH, no esgoto sintético, em torno de 4,5, porém este valor não permite o tratamento adequado do esgoto. Desta forma foi necessária a realização de um ajuste diário para valor igual a 8,0. Embora Estrada-Arriga e Mijaylova (2011), indicaram valores de pH entre 6,5 e 7,5, durante todo o processo de tratamento, os autores não citam a realização da correção do pH. Segundo Von Sperling (2012), os valores de pH tipicamente encontrados em esgoto bruto estão entre 6,7 e 7,5.

Entretanto, o ajuste realizado não foi suficiente para manter o pH em níveis satisfatórios, ocorrendo uma redução neste valor ao longo do processo de tratamento. Como não era desejável fazer interferências no funcionamento do reator, como o ajuste do pH de forma mais frequente, optou-se por avaliar o comportamento do sistema, mesmo com valores médios de pH no interior do reator de 5,8.

Com relação à remoção das variáveis ambientais, o reator apresentou remoção média de DQO superior a 91,0%, para todo o período de ensaios, conforme gráfico apresentado na Figura 4.14. Tal remoção foi, provavelmente, alcançada pela degradação biológica e pela presença da membrana. Mesmo considerando o tratamento de um esgoto sintético, a porcentagem de remoção de DQO esteve muito próxima da obtida por Radjenovic, Petrovic e Barceló (2007), onde o tratamento de um esgoto real foi realizado por um sistema piloto de MBR e a remoção média de DQO foi de 90,4%.

Figura 4.14 – Valores referentes a concentração e eficiência de remoção de DQO verificados na entrada e na saída do reator.



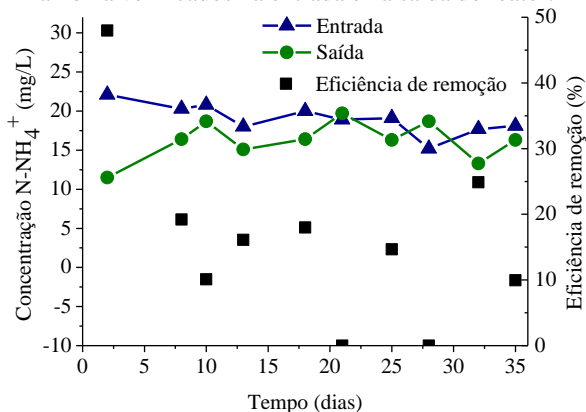
Segundo Radjenovic, Petrovic e Barceló (2007) e Sun, Hay e Khor (2006), a remoção de DQO é atribuída à combinação da completa retenção de material particulado pela membrana, que representa uma fase adicional de purificação, através da retenção da DQO particulada remanescente, com a redução de problemas de lavagem da biomassa, ao contrário do que ocorre em sistemas de lodos ativados convencionais.

Considerando o trabalho de Estrada-Arriga e Mijaylova (2011), o composto utilizado para fornecer DOQ ao esgoto sintético, como principal fonte de carbono, foi o metanol. Porém, deve-se considerar que esta substância não está comumente presente em amostras reais de esgoto doméstico.

A eficiência média de remoção de amônia apresentada por este sistema, nas condições adotadas, foi inferior a 15,0%, conforme verificado no gráfico da Figura 4.15. Este resultado foi corroborado pelos baixos valores de concentração de nitrito e nitrato obtidos para as mesmas amostras, confirmando a não ocorrência do processo de nitrificação. Além disso, os resultados obtidos pelos ensaios respirométricos, mostram uma baixa taxa de consumo de oxigênio (TCO) por bactérias autotróficas, responsáveis pelo processo de conversão da amônia em nitrito e nitrato.

Os baixos valores de eficiência de remoção de amônia, obtidos neste sistema, foram atribuídos a dois fatores. Primeiramente, constatou-se que o lodo ativado, selecionado para inocular o reator, não estava sendo eficiente na remoção biológica de amônia em seu local de origem, mesmo sendo uma ETE planejada para operar em condições de aeração prolongada, onde a remoção de nutrientes é favorecida pela presença de microrganismos de crescimento lento.

Figura 4.15 – Valores referentes a concentração e eficiência de remoção de amônia verificados na entrada e na saída do reator.



Além deste fato, o processo de nitrificação pode ter sido inibido pelo baixo pH encontrado no esgoto sintético, sendo verificado um valor de pH no interior do reator entre 5,5 e 6,6. Metcalf e Eddy (2003) afirmam que valores de pH abaixo de 6,8 diminuem consideravelmente a taxa de nitrificação. Segundo Von Sperling (2012) o pH ideal para a ocorrência e manutenção do processo de nitrificação encontra-se entre 7,2 e 8,0. Miura et al. (2007), também observaram uma nitrificação deficiente, em valores de pH inferiores a 5,5.

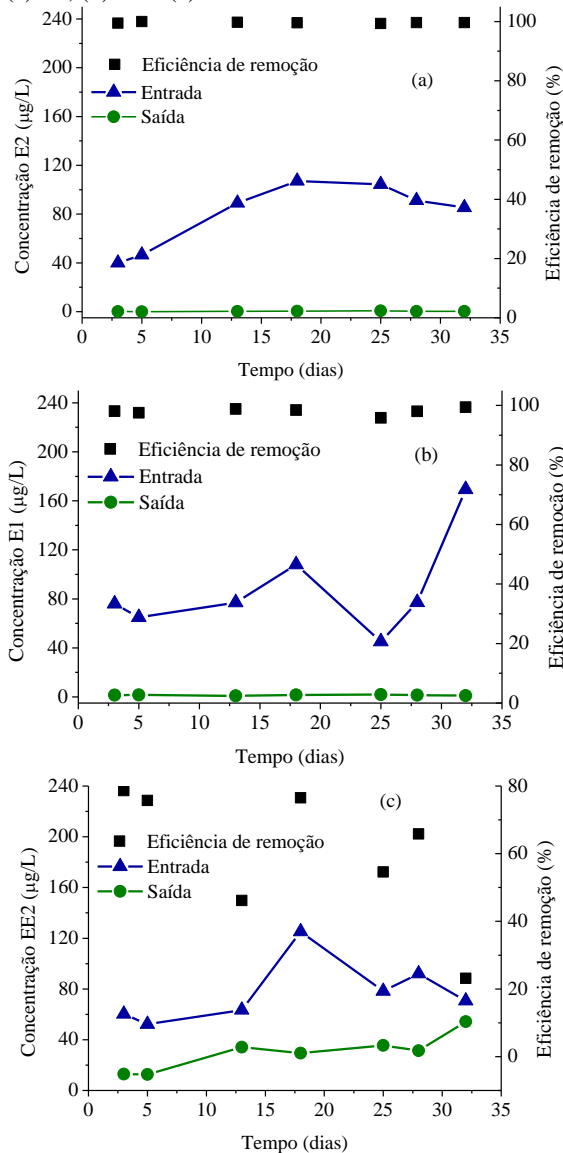
4.4.2 Avaliação do comportamento do sistema em relação a eficiência de remoção de hormônios

O sistema de biorreator a membrana apresentou elevada eficiência de remoção dos estrogênios naturais, com valores médios de remoção de 98,4 e 99,6% para E1 e E2, respectivamente, conforme Figura 4.16a e b. Já o estrogênio sintético EE2 foi removido de forma menos eficiente, 65,1% (Figura 4.16c), confirmando a relevante persistência deste composto. Tal comportamento também foi verificado por Weber et al. (2005), onde foram comparados lodos provenientes de dois sistemas, lodo ativado convencional e biorreator a membrana, sendo que a remoção de EE2 foi baixa em ambos os casos. Maeng et al. (2013) obtiveram remoção de 70,6 e 78,1% para EE2 com tempo de retenção de sólidos (TRS) de 20 e 80 d, respectivamente.

A baixa remoção de EE2 obtida com o reator MBR pode estar associada, principalmente, à nitrificação ineficiente, que foi observada neste estudo. Portanto, é possível deduzir que a remoção de EE2 é, em parte, realizada por microrganismos nitrificantes através do processo de cometabolismo, conforme verificado por Vader et al. (2000).

Segundo Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011), maiores taxas de nitrificação são acompanhadas proporcionalmente por maiores remoções de estrogênios. Os resultados obtidos por Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) e Gunnarsson et al. (2009) indicaram altas eficiências de remoção de E1, E2 e EE2, utilizando sistemas piloto de MBR para tratamento de esgoto, acima de 99,0% (TRS de 60 d e TDH de 12 h) e superior a 90,0% (TRS de 87 d e 78,0% de remoção de nitrogênio total).

Figura 4.16 – Valores referentes a concentração e eficiência de remoção de hormônios (a) E2, (b) E1 e (c) EE2 verificados na entrada e na saída do reator.



Maeng et al. (2013) avaliaram a influência da nitrificação na remoção de estrogênios e fármacos em um MBR e verificaram que, após a adição de alitiouréia (ATU) no sistema (que reduziu a nitrificação em cerca de 80,0%, por inibição da atividade biológica de bactérias autotróficas), a eficiência de remoção de EE2 foi afetada em 90,0%. Neste estudo observou-se que a remoção de EE2 também foi prejudicada pela baixa eficiência do processo de nitrificação, porém de forma menos acentuada.

O processo de adsorção dos hormônios no lodo do reator, provavelmente, contribui para as elevadas eficiências de remoção dos estrogênios naturais, bem como para a menor, porém relevante, eficiência de remoção de EE2. Este lodo permaneceu retido no reator devido à presença da membrana, a qual atua como uma barreira física. A remoção de EE2 obtida neste estudo, mesmo sem a ocorrência da nitrificação, pode estar associada aos baixos valores de pH encontrados no interior do reator. Segundo Feng et al. (2010), valores de pH entre 2,0 e 6,0, promoveram as maiores adsorções de EE2 no lodo, enquanto que valores de pH acima de 6,0 reduziram consideravelmente a capacidade de adsorção do estrogênio sintético. Além disso, altos valores de pH não são favoráveis ao processo de adsorção, pois Clara et al. (2004b) observaram a liberação de mais de 80,0% da concentração de EE2, adsorvido no lodo, em pH em torno de 12.

Finalmente, constatou-se que as condições operacionais poderiam ser mantidas, para uso na fase de comparação dos sistemas LA e MBR. Entretanto, verificou-se a necessidade de alterar as condições de alimentação do sistema, pois foi constatado que as características apresentadas pelo esgoto sintético, como valor de pH e fonte de carbono, não contribuíram com o desempenho do reator, em termos de eficiência de remoção de nitrogênio e hormônios. Desta forma, optou-se por substituir o esgoto sintético por outra solução, com características mais semelhantes a uma amostra de esgoto doméstico.

Além disso, o inóculo não apresentou um histórico de remoção de nutrientes em sua ETE de origem, para os meses que antecederam a coleta do mesmo. Portanto, o lodo, utilizado como inóculo foi substituído por um lodo proveniente de um reator MBR híbrido de leito móvel (KELLNER, 2014), também operado na forma de batelada

sequencial, com excelente resultado de eficiência de remoção de amônia (99,5%).

4.5 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE BIORREATOR À MEMBRANA E LODOS ATIVADOS (QUARTA ETAPA)

Este tópico é composto pelos resultados obtidos durante a operação de dois reatores piloto, um sistema de lodos ativados (LA) e um sistema de biorreator à membrana (MBR), operados em batelada sequencial. Ambos os reatores foram alimentados com a mesma solução de esgoto sintético, inoculados com a mesma biomassa e operados em paralelo, nas mesmas condições operacionais possíveis.

Os reatores apresentaram comportamentos diferentes com relação a eficiência de remoção de algumas variáveis, ao longo do período de monitoramento (120 dias). O período composto pelos três primeiros meses foi considerado como uma fase de adaptação da biomassa, com relação às características do esgoto sintético e a forma de operação dos sistemas. Este período corresponde ao monitoramento dos reatores por três vezes o TRS de 30 dias. O último mês de acompanhamento dos reatores foi considerado o período em que as condições adotadas permaneceram estáveis, e a biomassa esteve completamente adaptada a estas condições.

Os resultados são apresentados em três tópicos distintos, sendo que o primeiro expõe as condições operacionais, físico-químicas e biológicas, nas quais os sistemas foram mantidos, o segundo tópico trata do desempenho dos reatores na remoção de compostos diretamente relacionados a contaminação dos corpos hídricos, como orgânicos, nitrogenados e fosfatados, e no último tópico os resultados obtidos foram relacionados.

4.5.1 Condições operacionais

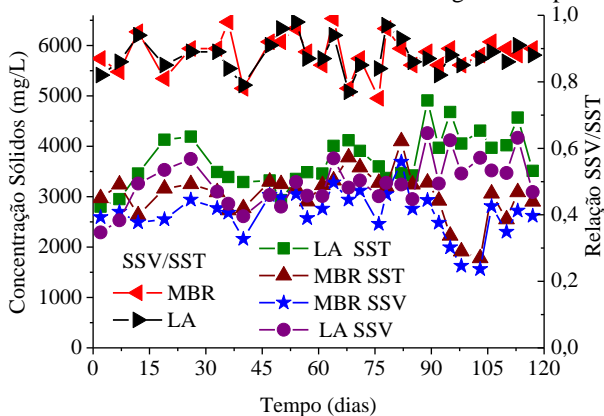
Os reatores foram monitorados duas vezes por semana para manutenção das condições operacionais. A partir dos dados de projeto, foi estabelecido um valor de tempo de retenção de sólidos (TRS) de 30 dias. Porém, devido às variações operacionais, ocorridas

principalmente no período inicial de operação dos sistemas, os valores médios obtidos ao longo dos 120 dias de monitoramento foram de 35 e 33 dias para os reatores MBR e LA, respectivamente.

Os reatores foram iniciados com 3000 mg/L de SSV, sendo este o melhor valor encontrado para a remoção de hormônios nos ensaios apresentados na primeira etapa. Conforme se observa na Figura 4.17a, ocorreu uma variação maior na concentração de sólidos no interior dos reatores no primeiro mês de operação, devido ao período de adaptação do sistema às novas condições operacionais. Na sequência, a tendência foi a aproximação dos valores entre os reatores.

Após 90 dias de operação, o reator MBR apresentou uma queda na concentração de sólidos (Figura 4.17). Esta redução não está relacionada com a remoção de sólidos do reator, mas sim com o seu acúmulo no módulo de membrana. Por esta razão, faz-se necessária uma limpeza física, frequente, do módulo em reatores de pequena escala, como o utilizado neste estudo. Esta limpeza, que consiste na remoção dos sólidos aderidos com o auxílio de jatos de água, foi realizada no dia 105 de operação, aumentando novamente a concentração de sólidos dentro do sistema. A relação SSV/SST é apresentada na Figura 4.17. Os valores foram semelhantes entre os reatores, com média de $0,88 \pm 0,05$ para ambos.

Figura 4.17 – Valores de concentração de SST e SSV e relação SSV/SST, encontrados nos reatores LA e MBR ao longo do tempo*.



* Limpeza do módulo de membrana no dia 105.

Biorreatores a membrana são comumente operados com altas concentrações de SSV. Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) utilizaram valores entre 5000 e 8000 mg/L. Cases et al. (2011) adotaram valores de SST de 8000 mg/L. Maeng et al. (2013) trabalharam com valores entre 4000 e 15000 mg/L de SST. Neste estudo, como o objetivo era comparar dois sistemas em condições semelhantes, optou-se por adotar valores próximos a 3000 mg/L para ambos. Valores muito elevados não são indicados para sistemas de lodos ativados devido à possibilidade de perda da biomassa durante o tratamento.

As cargas orgânica e nitrogenada volumétricas (COV e CNV) apresentaram valores médios de $709,5 \pm 183,7$ mgDOQ/L.d e $35,2 \pm 5,3$ mgN-NH₄⁺/L.d, respectivamente, e variação ao longo do período operacional conforme Figura 4.18a. Sendo que os valores médios encontrados no esgoto sintético para DQO e amônia foram de $591,3 \pm 153,0$ mg/L e $29,3 \pm 4,4$ mg/L, respectivamente. Estes valores são indicativos de um esgoto entre médio e forte, estando mais próximo de um esgoto médio, segundo os valores recomendados por Jordão e Pessôa (2009).

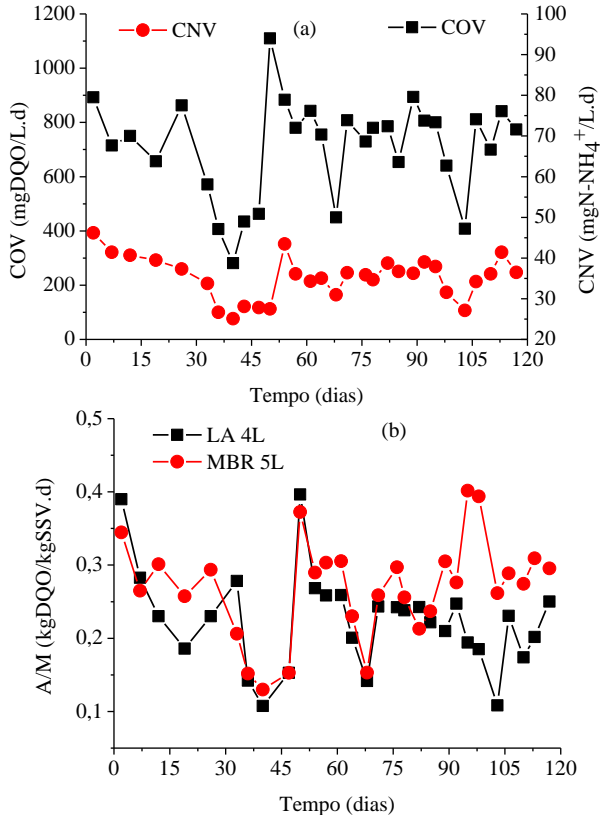
A relação média de A/M (alimento/microrganismo) foi de 0,22 kgDQO/kgSSV.d para o reator LA e de 0,27 kgDQO/kgSSV.d para o reator MBR com desvio de 0,06 para ambos (Figura 4.18b). Estimando o valor da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), através da relação DQO/DBO igual a 2,1 (faixa de 1,7 a 2,5 recomendada por Jordão e Pessôa, (2009)), os valores encontrados para A/M foram de $0,10 \pm 0,03$ kgDBO/kgSSV.d para LA e de $0,13 \pm 0,04$ kgDBO/kgSSV.d para MBR. Segundo a norma brasileira (NBR-12209, 2011) considera que valores menores ou iguais a 0,15 kgDBO/kgSSV.d, são típicos de sistemas de aeração prolongada.

Além disso, é possível observar que os valores de A/M seguem uma tendência bastante semelhante entre os reatores (Figura 4.18b), sendo observado um afastamento nestes valores somente após 90 dias de operação, acompanhado pela redução na concentração de SSV para o reator MBR, também observada neste período.

Os reatores foram instalados em uma sala com controle de temperatura, portanto os valores foram mantidos entre 24,0 e 26,0 °C (Figura 4.19). O oxigênio dissolvido (OD) foi mantido dentro dos reatores em valores superiores a 6,0 mg/L (Figura 4.19). Os valores

médios referentes a temperatura e oxigênio dissolvido, foram de $24,3 \pm 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$ e $7,2 \pm 0,7 \text{ mg/L}$ para o reator LA, e $24,3 \pm 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$ e $7,7 \pm 0,9 \text{ mg/L}$ para o reator MBR, respectivamente. Altos valores de OD ($8,4 \pm 0,6 \text{ mg/L}$) também foram adotados por Gusseme et al. (2009), durante a operação de um MBR.

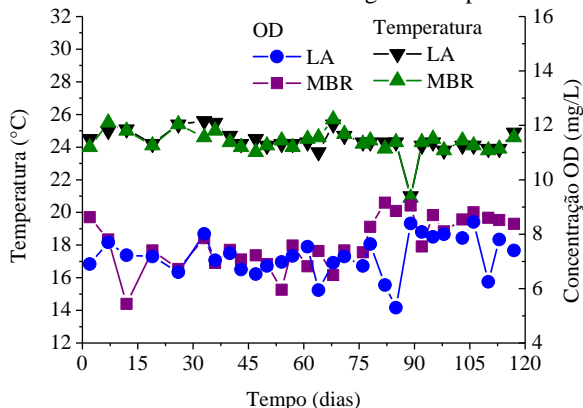
Figura 4.18 - Cargas volumétricas aplicadas, orgânica (COV) e nitrogenada (CNV) (a), e relação alimento/microrganismo (A/M) (b).



O sistema de aeração utilizado neste estudo foi responsável pelo fornecimento de oxigênio, necessário ao metabolismo das bactérias, e também para manter a homogeneidade da biomassa, pois não foram

introduzidos misturadores aos sistemas, justificando desta forma, as elevadas concentrações de OD obtidas. Entretanto, deve-se avaliar o gasto energético relacionado à utilização de elevadas concentrações de OD em estações de tratamento de esgoto.

Figura 4.19 – Valores de oxigênio dissolvido e temperatura, encontrados nos reatores LA e MBR ao longo do tempo.

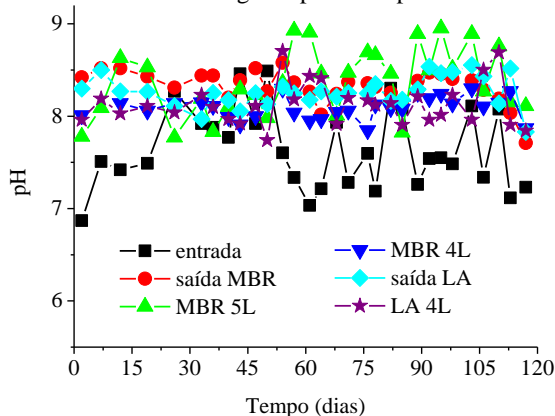


O pH do esgoto sintético afluente aos reatores, se manteve acima de 7,0, já as amostras coletadas na saída dos reatores (saída MBR e saída LA) apresentaram valores de pH entre 7,5 e 9,0. A amostra identificada como MBR 5L, ou seja, amostra retirada após o enchimento do reator MBR, apresentou a maior variação de valores, mas ainda dentro desta faixa (Figura 4.20). Os valores de pH obtidos neste estudo estão próximos dos valores estabelecidos por Gusseme et al. (2009), de $7,4 \pm 0,03$, durante a operação de um MBR e por López-Fernandez et al. (2013), de $7,0 \pm 0,4$, para o afluente dos sistemas, lodos ativados e MBR.

Com relação ao índice volumétrico de lodo (IVL), foram obtidos valores médios de 55,8 mL/g para o reator LA e 142,8 mL/g para o reator MBR. Adotando os critérios estabelecidos por Von Sperling (2012), os valores obtidos para LA e MBR encontram-se na faixa de sedimentabilidade boa e média, respectivamente. Os valores encontrados por Monsalvo, Shanmugam e Horan (2012) ficaram entre 89,8 e 224,2 mL/g para o reator em batelada sequencial (SBR -

sequencing batch reactor) e entre 221,9 e 324,5 mL/g para MBR. Sendo que, estes valores estão enquadrados entre a sedimentabilidade boa e péssima, segundo os parâmetros sugeridos por Von Sperling (2012).

Figura 4.20 – Valores de pH obtidos em todos os pontos de coleta dos reatores LA e MBR ao longo do período operacional.



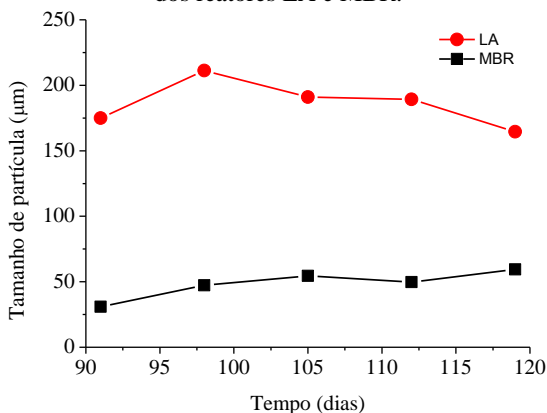
A granulometria das amostras de lodo, retiradas do interior de cada reator, foi determinada no último mês de operação dos reatores. Os resultados, apresentados na Figura 4.21, indicam que as partículas do reator LA apresentaram tamanho médio maior do que as partículas do reator MBR, no período avaliado. Os valores médios obtidos foram de $186,2 \pm 17,7 \mu\text{m}$ e $48,4 \pm 10,8 \mu\text{m}$ para os reatores LA e MBR, respectivamente. Provavelmente, esta diferença se deve ao processo de separação entre sólidos e líquidos, distinto em cada reator, sendo a sedimentação gravitacional no reator LA e a filtração por membranas no reator MBR.

É possível correlacionar os resultados obtidos nas análises de IVL e granulometria. O tamanho médio dos flocos influencia na capacidade de sedimentação do lodo. Os resultados mostram que a sedimentabilidade do lodo foi melhor no reator LA, que apresentou flocos maiores.

Joss et al. (2004) compararam lodos provenientes dos sistemas de tratamento de lodos ativados e biorreator a membrana e constataram que o tamanho dos flocos influencia significativamente na remoção dos

estrogênios. Os autores observaram que a maior remoção obtida no MBR foi promovida pelo menor tamanho das partículas (80 versus 400 μm) que disponibiliza uma maior área superficial, ou seja, maior quantidade de sítios ativos que contribuem para o aumento da remoção dos compostos devido ao processo de adsorção.

Figura 4.21 – Valores de granulometria obtidos a partir das amostras de lodo dos reatores LA e MBR.

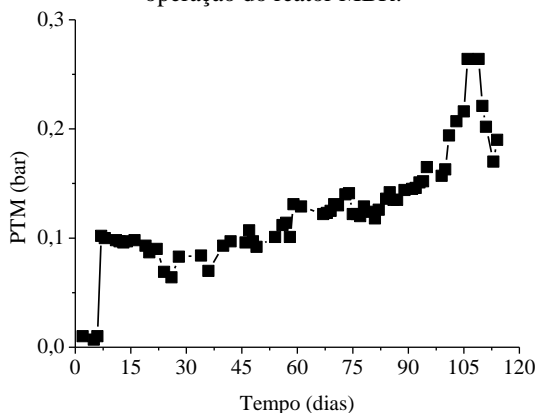


Valores médios de 10,0 e 120,0 μm de tamanho de partícula foram obtidos para reatores MBR e SBR, respectivamente, por Yi et al. (2006). Devido ao menor tamanho dos flocos no reator MBR, a área superficial da biomassa deste reator é maior. No trabalho de Monsalvo, Shanmugam e Horan (2012), foram obtidos valores de 500 μm para um reator SBR e 14,6 μm para um reator MBR. As condições operacionais típicas de reatores MBR causam a fragmentação dos flocos. A maioria dos estudos com MBR relata a ocorrência de flocos pequenos, irregulares e fragmentados, com uma grande quantidade de bactérias dispersas (MONSALVO; SHANMUGAM; HORAN, 2012).

Na Figura 4.22 é possível observar os valores de pressão transmembrana (PTM) obtidos ao longo dos 120 dias de operação do reator MBR, sendo o fluxo constante de 2,08 $\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$. Os módulos de membrana utilizados nos reatores MBR deste trabalho e de Kellner (2014), foram adquiridos junto ao mesmo fabricante (PAM membranas) e apresentaram a mesma configuração.

O trabalho desenvolvido por Kellner (2014), a partir de ensaios preliminares, estabeleceu um valor limite de pressão transmembrana de 0,5 bar, sendo possível a ocorrência de danos às fibras da membrana caso o sistema operasse acima deste valor limite. Para evitar tal dano, uma limpeza química, com soluções alcalina e ácida, é recomendada.

Figura 4.22 – Valores de pressão transmembrana obtidos durante o período de operação do reator MBR.



Este mesmo valor foi usado como limite de PTM para o sistema MBR. Como durante o período operacional, o valor de 0,5 bar não foi atingido, não foi realizada limpeza química no módulo de membranas. O único procedimento realizado foi a retirada manual dos sólidos aderidos superficialmente, nas extremidades do módulo e nas fibras das membranas, quando eram verificadas quedas na concentração de sólidos suspensos voláteis. Os valores de PTM se mantiveram baixos devido ao baixo fluxo utilizado ($2,08 \text{ L/m}^2 \cdot \text{h}$) ao longo do período operacional. Kellner (2014) adotou um fluxo de $6,74 \text{ L/m}^2 \cdot \text{h}$, três vezes superior ao praticado neste estudo, sendo possível realizar o tratamento de um volume maior de esgoto, porém a limpeza química da membrana foi realizada com maior frequência.

4.5.1.1 Microscopia

Ao longo dos 120 dias de funcionamento dos reatores, análises microscópicas foram realizadas mensalmente, a partir do lodo coletado no interior de cada reator em estudo, com o intuito de avaliar a diversidade microbiológica presente nos sistemas. Na Figura 4.23 são apresentadas as imagens de alguns dos microrganismos identificados, sendo possível observar uma grande variedade de protozoários e metazoários, e a ausência de bactérias filamentosas, responsáveis por afetar a sedimentação em processos de lodos ativados.

Os reatores apresentaram diversidade de microrganismos bastante semelhante, sendo que a ocorrência dos mesmos foi maior no reator de lodos ativados. Foram encontrados protozoários, ciliado pedunculado, como *Epistypis* e *Vorticella*, rastejantes, como *Aspidisca* e metazoários como rotíferos, nematóides e *Aeolosoma*. Estes organismos também foram observados por Monsalvo, Shanmugam e Horan (2012), na avaliação de reatores SBR e MBR. Segundo Bento et al. (2005), o grupo dos micrometazoários, compostos por Rotíferos, Nematóides, Anelídeos e Tardígrados, possui lenta taxa de crescimento e, portanto indica alto tempo de retenção de sólidos.

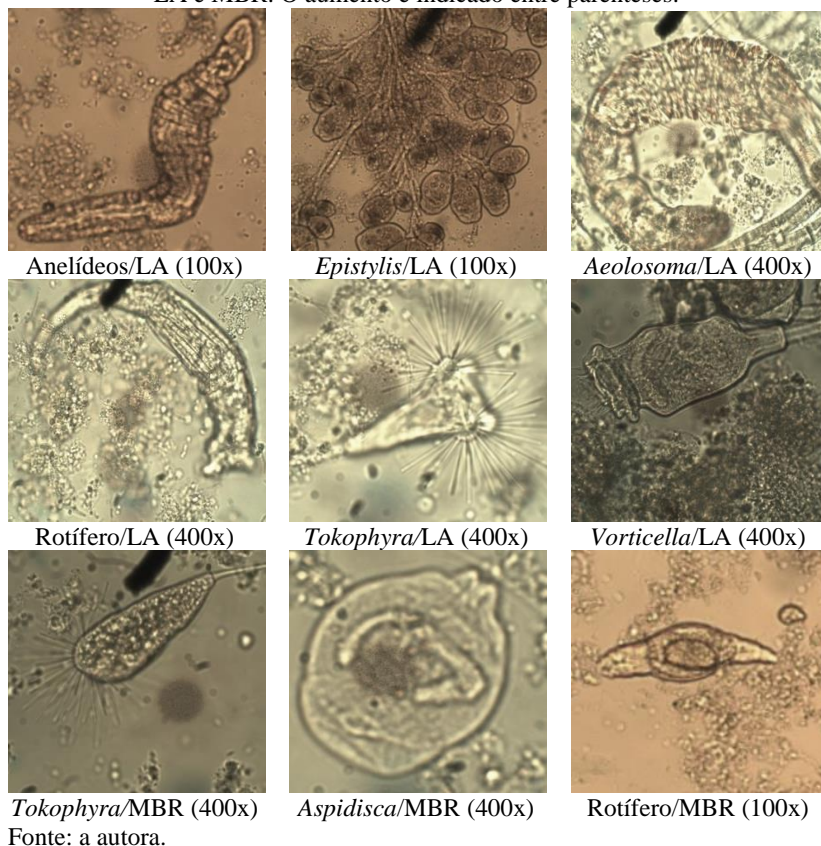
Os microrganismos encontrados são indicativos de boa atividade microbiana, baixa carga orgânica e operação estável (HOFFMANN, 2004). No entanto, foi verificada baixa densidade de microrganismos, resultado este em concordância com a observação de Hoffmann (2004), onde a densidade dos protozoários e dos metazoários, no lodo com alto TRS, foram relativamente baixas, podendo desaparecer em idades superiores a 30 dias.

Um dos efeitos mais significativos oriundo da presença de protozoários e metazoários, em processos de lodos ativados, é a redução da produção de biomassa e regulação das estruturas morfológicas e taxonômicas da comunidade bacteriana. Os protozoários ou metazoários reduzem a produção de lodo através da introdução de uma fase adicional de mineralização, em que o lodo é convertido em nova biomassa, água e dióxido de carbono (MONSALVO; SHANMUGAM; HORAN, 2012; WANG et al., 2013).

Os rotíferos apresentam dois efeitos distintos no material particulado em suspensão: consumo de bactérias dispersas e micro

partículas; e melhora da sedimentação pelo aumento da agregação dos flocos (ZHOU et al., 2008). A presença dos anelídeos é favorecida pela alta concentração de oxigênio dissolvido, superior a 3,0 mg/L. Rotíferos e anelídeos foram verificados com frequência, nas amostras de ambos os reatores, durante as observações microscópicas.

Figura 4.23 – Microrganismos identificados nas amostras de lodo dos reatores LA e MBR. O aumento é indicado entre parênteses.



A elevada densidade de protozoários, especialmente espécies predadoras, afeta substancialmente o número de bactérias de vida livre,

promovendo a agregação das células. Uma concentração elevada de bactérias de vida livre é comumente observada no MBR, devido a retenção completa da biomassa exercida pela membrana, e isso muitas vezes leva a um aumento da pressão transmembrana. Assim, a abundância de protozoários pode exercer um importante papel no controle da colmação em reatores MBR (MONSALVO; SHANMUGAM; HORAN, 2012).

4.5.1.2 Respirometria

As análises respirométricas foram realizadas na amostra referente ao inóculo, e em amostras de lodo coletadas após 84 e 112 dias de operação dos reatores, com o intuito de verificar a atividade das bactérias autotróficas e heterotróficas através da quantificação do oxigênio consumido pelas mesmas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.5 para os reatores MBR e LA.

Observa-se que, em ambos os reatores, a quantidade de oxigênio consumida é maior pelas bactérias heterotróficas, sendo que as mesmas são mais abundantes no reator MBR no período avaliado. No entanto, a atividade das bactérias heterotróficas diminuiu, em ambos os reatores, na comparação entre os dias de operação 84 e 112. Entretanto, os valores obtidos encontram-se na faixa observada por Liang et al. (2010) ($46,9 \pm 7,6$ e $30,8 \pm 6,6$ $\text{mgO}_2/\text{gSSV.h}$) para dois reatores piloto MBR (um apresenta alternância entre as condições anóxica e aeróbia e o outro apresenta um biofilme aderido a um suporte plástico que ocupa 50,0% de seu volume), operados em TRS de 20 d e alimentados com esgoto sintético. Isto indica que, apesar da redução nos valores obtidos, a atividade das bactérias heterotróficas continua significativa.

Já a presença das bactérias autotróficas é menor e semelhante entre os reatores. Sendo que os valores obtidos por Liang et al. (2010) foram maiores ($30,4 \pm 6,1$ e $22,5 \pm 5,9$ $\text{mgO}_2/\text{gSSV.h}$). Entretanto, os reatores utilizados neste trabalho apresentaram excelente eficiência de remoção tanto para amônia quanto para nitrito, conforme discutido na próxima seção (4.5.2), confirmando a elevada atividade das bactérias autotróficas. Já os valores obtidos por Sabia, Ferraris e Spagni (2013) foram inferiores ($2,7 \pm 0,5$ $\text{mgO}_2/\text{gSSV.h}$ para bactérias autotróficas com amônia como substrato) em um MBR aeróbio operado em TRS de

25 d e TDH de 8 h, este reator apresentou elevada eficiência de remoção de amônia, superior a 98,0%. Portanto, os valores obtidos são suficientes para garantir uma efetiva remoção de amônia do sistema.

Tabela 4.5 – Valores da taxa de consumo de oxigênio para as bactérias presentes nos reatores em mgO₂/gSSV.h.

Grupo de microrganismo	Dia de operação / reator				
	Inóculo	84/MBR	112/MBR	84/LA	112/LA
Autotrófica (Amônia)	7,2	6,8	6,8	9,6	5,2
Autotrófica total	9,5	7,2	9,8	10,7	9,5
Heterotrófica	27,5	68,7	52,7	44,6	34,1

4.5.1.3 Comunidade bacteriana

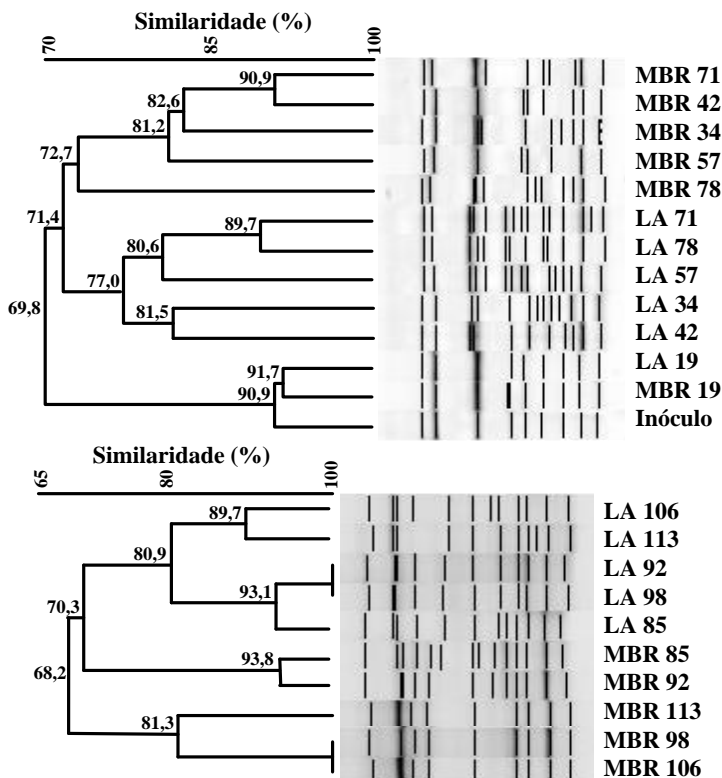
A diversidade da comunidade bacteriana, presente no lodo dos reatores, foi avaliada e comparada através de análises moleculares como PCR e DGGE. As análises foram separadas em dois grupos, sendo o primeiro referente as amostras coletadas nos três primeiros meses, e o segundo referente as amostras coletadas no último mês de monitoramento, totalizando 120 dias. A imagem visualizada na Figura 4.24 se refere ao gel de DGGE e a análise de cluster, onde podem ser identificadas as similaridades entre cada amostra de cada grupo.

Considerando a comparação realizada com as amostras dos dois reatores no primeiro período, Figura 4.24a, observa-se que as amostras, pertencentes a um mesmo reator, porém coletadas em diferentes dias, foram agrupadas entre si, com exceção da primeira amostra retirada no dia 19, em ambos os reatores, que apresenta maior similaridade com a amostra do inóculo. Já no segundo grupo, Figura 4.24b, as amostras dos dias 85 e 92, do reator MBR, apresentaram maior similaridade com as amostras do reator LA do que com as amostras do próprio reator MBR coletadas em dias diferentes.

Quando as amostras de cada reator são agrupadas separadamente, observa-se que a menor similaridade, verificada entre as amostras pertencentes ao reator MBR, foi de 68,6%, nos três primeiros meses de monitoramento. Considerando o último mês, verifica-se que a

similaridade entre as amostras deste reator foi superior a 68,1%, valor bastante semelhante ao verificado no primeiro grupo. Entretanto, os valores de similaridade obtidos para as amostras do reator LA passaram de 70,1% no primeiro período para 80,9% no segundo período, representando um aumento de, aproximadamente, 10,0%.

Figura 4.24 – Perfil de bandas do gel de DGGE da comunidade microbiana presente nos reatores LA e MBR (a) três primeiros meses e (b) último mês de monitoramento. Os números se referem ao dia de coleta da amostra no reator.



Através da visualização da imagem do gel de DGGE foi possível sugerir que a comunidade microbiana presente nos reatores é bastante heterogênea. Os gêneros de microrganismos presentes não foram

identificados, entretanto, os principais grupos de bactérias comumente encontrados em reatores biológicos são *proteobacteria*, *nitrospira*, *nitrosomonas*. Segundo Denecke et al. (2012) os membros dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira* representam as bactérias nitrificantes dominantes em sistemas de tratamento de lodos ativados.

Ambos os processos apresentam uma comunidade microbiana altamente diversificada e estruturada, sem a presença de espécies dominantes. Estas considerações estão de acordo com os resultados obtidos por Chiellini et al. (2013), em que os autores caracterizaram e compararam a diversidade da comunidade bacteriana, por meios de técnicas moleculares, presente em dois sistemas piloto (MBR e CAS (lodo ativado convencional)).

Durante a operação dos reatores, mudanças causadas nas condições operacionais podem ter provocado o esgotamento de espécies, presentes no inóculo. Do mesmo modo, populações presentes em baixa quantidade, inicialmente imperceptíveis, são identificadas no lodo, e a relativa persistência indica que estas espécies se adaptaram às novas condições do processo e as características do esgoto. Esta tendência também foi observada por Zhang et al. (2009) na avaliação de comunidades de bactérias oxidadoras de amônia (AOB) em MBR.

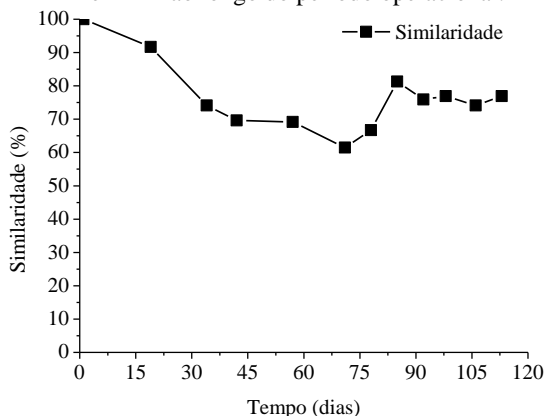
Na Figura 4.25 são apresentados os valores de similaridade, entre as amostras de cada reator, obtidos ao longo dos quatro meses de monitoramento. Inicialmente, as amostras eram iguais (100% de similaridade) devido à inoculação dos reatores ter sido realizada com o mesmo lodo, proveniente do biorreator a membrana híbrido de leito móvel (KELLNER, 2014). A similaridade entre as amostras diminuiu continuamente até o dia 71, voltou a aumentar, e atingiu a estabilidade a partir do dia 92, onde a média foi de $75,9 \pm 1,3\%$ até o último dia de funcionamento dos sistemas.

Apesar das diferenças obtidas entre as amostras coletadas em diferentes dias em um mesmo reator, a similaridade entre os dois reatores se mantém constante no último mês operacional. Este resultado indica que o comportamento dos reatores, com relação a remoção das variáveis de interesse, também poderá ser semelhante.

Otawa et al. (2006) observaram que, embora verificada a estabilidade na eficiência da planta de tratamento, a comunidade bacteriana muda durante o ano, mostrando que a estabilização na

eficiência do tratamento nem sempre significa estabilização da sua comunidade bacteriana. Os autores sugerem que variáveis como características do efluente e temperatura da água no reator, são cotadas como responsáveis por alterar a diversidade da comunidade bacteriana.

Figura 4.25 – Semelhança entre a comunidade bacteriana presente nos reatores LA e MBR ao longo do período operacional.



Miura et al. (2007) verificaram grandes mudanças na comunidade bacteriana, no início do processo operacional de um reator MBR, o que pode ser atribuída a adaptação da biomassa às novas condições (menor relação A/M e maior TRS). Os autores observaram que depois de cerca de 100 dias, pequenas flutuações na diversidade da comunidade de bactérias foram observadas, apesar da estabilização da qualidade da água do permeado. Isto foi em parte devido a flutuações dos parâmetros ambientais (temperatura, características do afluente, etc.) e/ou interação entre os membros da comunidade (por exemplo, predação).

Neste estudo, mesmo sendo utilizado um esgoto sintético, onde as características deveriam ser mantidas constantes, observa-se que a concentração das variáveis de interesse, na amostra afluente aos reatores, varia ao longo do período operacional. Esta variação se deve, principalmente, ao período em que o esgoto permaneceu no tanque de abastecimento, esperando o próximo ciclo, pois os sistemas operam na forma de batelada sequencial. Este tempo de espera (máximo 12 h) promoveu variações nas características do esgoto como, por exemplo,

mudanças nas concentrações de DQO e hormônios. Estas variações interferem diretamente na diversidade da comunidade bacteriana presente em cada sistema, conforme observado por Otawa et al. (2006) e Miura et al. (2007) e discutido acima.

Boon et al. (2002) chamam a atenção, para o fato de que a diversidade refletida pelo perfil bacteriano, presente no gel de DGGE, é referente apenas as espécies numericamente dominantes, e não representa o número total de espécies diferentes presentes em amostras ambientais. Além disso, estes autores esclarecem que os perfis de bandas do gel de DGGE para bactérias e α -proteobactérias são muito complexos, estes grupos apresentam não apenas um alto número de células na comunidade microbiana do lodo ativado, mas também um alto número de espécies diferentes (ribotipos).

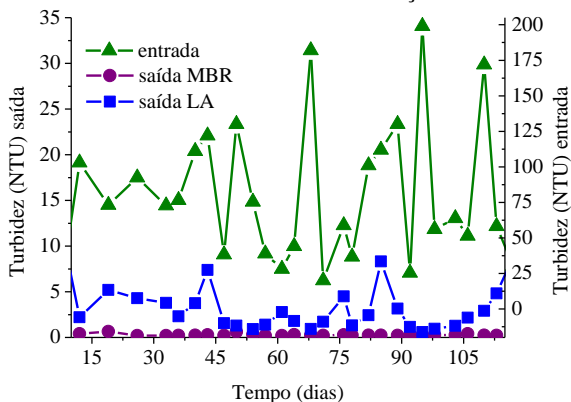
4.5.2 Eficiência de remoção

Os reatores foram monitorados duas vezes por semana para verificação e comparação da eficiência de remoção, dos contaminantes em estudo. As variáveis foram quantificadas em diferentes pontos dos reatores, sendo estes: Entrada – amostra de esgoto sintético; Saída MBR – permeado ao reator MBR; Saída LA – sobrenadante ao reator LA; MBR 5L – amostra retirada do interior do reator MBR, 5 min após o enchimento, volume máximo de 5 L; LA 4L – amostra retirada do interior do reator LA, 5 min após o enchimento, volume máximo de 4 L; MBR 4L – amostra retirada do interior do reator MBR após 3 h de reação, quando o reator atinge seu volume mínimo de 4 L.

4.5.2.1 Eficiência de remoção das variáveis físico-químicas

Como variáveis físico-químicas foram consideradas: turbidez, DQO, amônia, nitrito, nitrato e fosfato. A análise de turbidez foi realizada nas amostras da entrada e da saída (sobrenadante e permeado) dos reatores. Os valores médios de turbidez encontrados no esgoto sintético foram de $82,2 \pm 48,6$ NTU. O perfil obtido ao longo do tempo, para as amostras efluentes aos reatores e para o esgoto sintético, são apresentados na Figura 4.26.

Figura 4.26 – Valores de turbidez encontrados na saída dos reatores LA e MBR e eficiência de remoção.



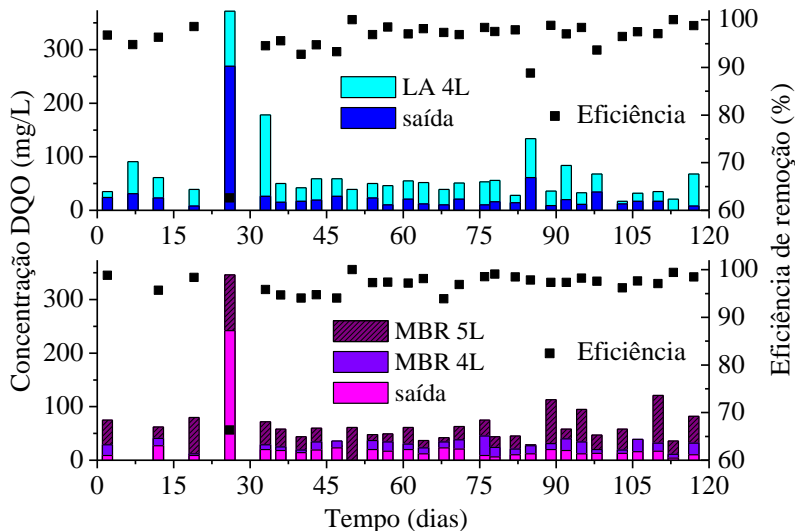
Os valores de turbidez encontrados no permeado do reator MBR são baixos ($0,3 \pm 0,1$ NTU) devido à presença das fibras de membranas, que são capazes de reter partículas maiores do que $0,3 \mu\text{m}$. Apesar do reator de lodos ativados ter utilizado o sistema de separação por sedimentação, os valores de turbidez encontrados na saída do reator LA também são baixos ($3,3 \pm 2,9$ NTU). Este resultado foi atribuído ao sistema de retirada do sobrenadante, os orifícios, presentes na tubulação, através dos quais o líquido era removido do sistema, apresentaram diâmetro bastante reduzido ($0,47 \text{ mm}$), impedindo a passagem de sólidos.

Na Figura 4.27 constam os gráficos referentes aos valores de DQO encontrados em todos os pontos de amostragem dos sistemas estudados. A eficiência média de remoção de DQO foi de $95,5 \pm 6,6\%$ para LA e $96,1 \pm 5,9\%$ para MBR para os 120 dias de funcionamento dos reatores. Verificou-se que a DQO segue uma tendência de diluição e degradação, ou seja, após a entrada no reator a concentração é reduzida devido à diluição promovida pelo líquido contido no reator, em seguida, os valores de concentração diminuem ao longo do ciclo de tratamento, devido ao processo de degradação e adsorção.

A eficiência de remoção de DQO nos três primeiros meses de operação dos reatores foi de $94,8 \pm 7,6$ para o reator LA e de $95,4 \pm$

6,9% para o reator MBR, os quais aumentaram no quarto e último mês de operação para $97,3 \pm 1,9\%$ e $97,7 \pm 0,9\%$, respectivamente.

Figura 4.27 – Valores de concentração e eficiência de remoção de DQO encontrados nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.



* Concentração de DQO no esgoto sintético = $591,3 \pm 153,0$ mg/L.

Os valores médios de DQO, para os 120 dias de monitoramento, obtidos no permeado e no sobrenadante, foram de 21,8 e 26,1 mg/L. Sendo que os valores obtidos para os três primeiros meses foram de 25,0 e 30,2 mg/L, e para o último mês de $12,9 \pm 4,5$ e $14,9 \pm 9,9$ mg/L para as amostras do permeado e do sobrenadante, respectivamente. Apesar do resultado superior apresentado pelo reator MBR, o reator LA apresentou um desempenho bastante eficiente na remoção da DQO, principalmente no ultimo mês de monitoramento, onde foi verificada a estabilidade dos sistemas.

Os melhores resultados obtidos no sistema MBR com relação ao sistema LA, para a variável DQO, são atribuídos à presença da membrana no reator MBR. Os valores médios de DQO encontrados na amostra MBR 4L (amostra coletada no fim do tratamento antes de

passar pela membrana) (37,0 mg/L) foram superiores aos valores encontrados no permeado (21,8 mg/L). Esta diferença foi obtida pela retenção dos compostos na membrana. Desta forma, aproximadamente, 15,0 mg/L de DQO foi removida pela membrana presente no sistema MBR.

Kellner (2014) fazendo uso de um reator MBR, composto por um módulo de membrana bastante semelhante ao utilizado neste trabalho, alcançou uma eficiência de remoção de DQO de 97,3%. Valor este, muito próximo ao encontrado nos reatores deste estudo. A eficiência média de remoção de DQO obtida por Racz, Muller e Goel (2012) foi de $99,2 \pm 1,2\%$ e $99,7 \pm 0,6\%$ para dois reatores SBR, um alimentado com peptona e o outro com glicose, respectivamente. Provavelmente, os melhores resultados obtidos por estes autores, são devidos ao maior TDH (33 h) aplicado, e ao estabelecimento de um período de funcionamento estável, onde os reatores foram operados por um ano.

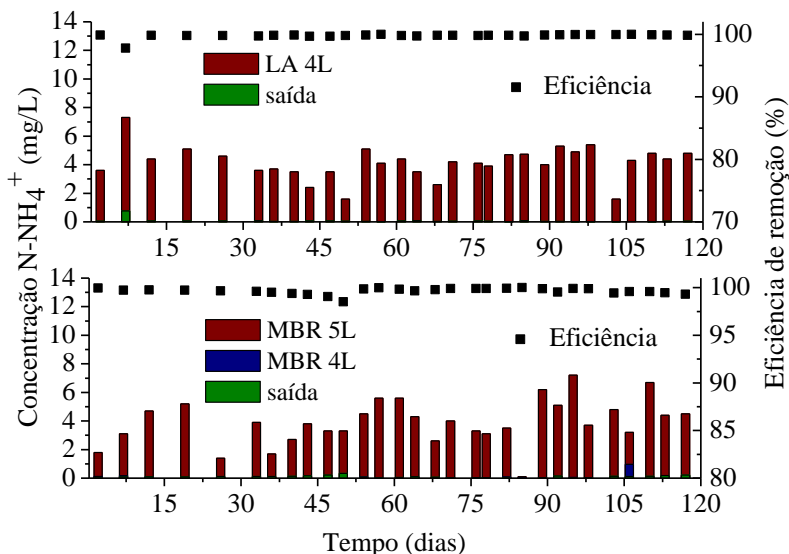
A eficiência de remoção de DQO obtida por Maeng et al. (2013) para um reator MBR operado com TRS de 20 dias foi de 98,7%. Este resultado foi semelhante ao obtido neste trabalho, utilizando um TRS de 30 dias, sendo que López-Fernández et al. (2013) sugerem que o TRS não influencia na remoção de DQO.

López-Fernández et al. (2013), avaliaram e compararam o desempenho de dois reatores, MBR e CAS em diferentes TRS (10 e 20 d). Uma maior eficiência de remoção de DQO foi obtida no reator MBR, 98,0%, sendo que a remoção obtida com o CAS foi de 94,0%. Segundo os autores, este resultado pode ser atribuído à redução da relação A/M no sistema MBR, aumentando a competição e a eliminação de carbono. No presente estudo, os valores obtidos para a relação A/M foram próximos ($0,22 \text{ d}^{-1}$ para o LA e $0,27 \text{ d}^{-1}$ para o MBR), não sendo observadas diferenças na remoção de DQO em ambos os sistemas.

A concentração de amônia também foi quantificada em todos os pontos (Figura 4.28). O composto foi detectado após o enchimento dos reatores e sofreu degradação ao longo do tempo, sendo que a remoção média foi de $99,8 \pm 0,4\%$ para o reator LA e de $99,6 \pm 0,3\%$ para o reator MBR. Os valores médios de concentração de amônia, encontrados nas amostras do permeado e do sobrenadante, foram de $0,10 \pm 0,08 \text{ mg/L}$ e de $0,07 \pm 0,13 \text{ mg/L}$, respectivamente. Estes resultados confirmam a alta capacidade de degradação de amônia exercida pela

biomassa. Além disso, observou-se que a ação das bactérias nitrificantes não sofreu interferência do período de adaptação, sendo que os valores obtidos, de eficiência de remoção de amônia, foram superiores a 99,5%, durante todo o período de funcionamento dos sistemas.

Figura 4.28 – Valores de concentração e eficiência de remoção de amônia nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.



* Concentração de N-NH₄⁺ no esgoto sintético = 29,3 ± 4,4 mg/L.

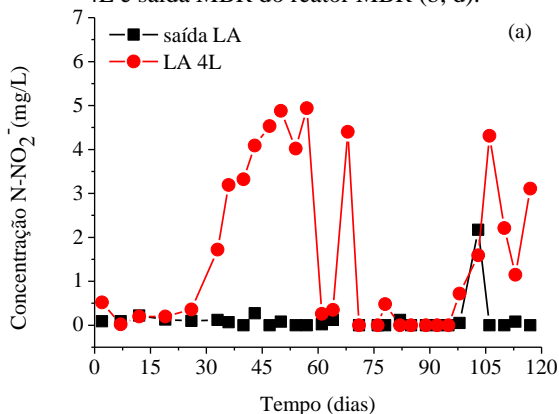
Os valores médios de eficiência de remoção de amônia, obtidos para o reator LA, foram superiores aos valores obtidos por Racz, Muller e Goel (2012) utilizando reatores SBR (98,7 ± 3,2% para SBR alimentado com peptona e 98,3 ± 2,3% para SBR alimentado com glicose). Estes autores observaram que o reator alimentado com peptona apresenta uma maior velocidade de degradação de amônia, sendo que este fato se deve a maior porcentagem de bactérias autotróficas existente neste reator.

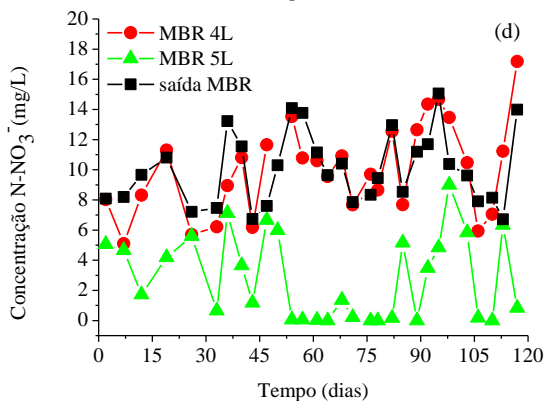
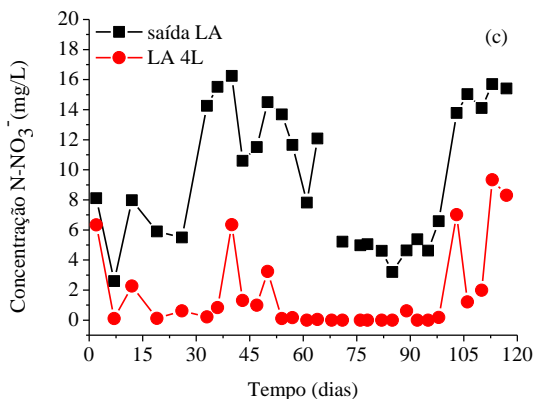
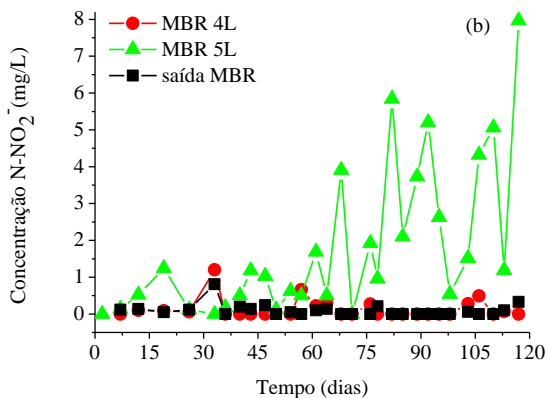
Observa-se que a remoção de amônia, obtidas em estudos com biorreatores a membrana, apresentou elevada eficiência. O reator MBR operado por Maeng et al. (2013) apresentou total remoção de amônia,

independente do TRS utilizado (8, 20 e 80 d), sendo que o composto não foi detectado na amostra efluente ao reator MBR. Por outro lado, na comparação de dois reatores (MBR e CAS) realizada por López-Fernández et al. (2013), foram observadas altas eficiências de remoção de amônia, 96,4% para CAS e 98,2% para MBR ambos operados em TRS de 20 dias, sendo que a remoção obtida em TRS de 10 dias foi inferior (92,7 e 94,6% respectivamente). Fan et al. (2014) avaliaram o comportamento de um MBR com membrana submersa e obtiveram eficiência média de remoção de amônia de 88,6% em TRS infinito.

Os valores de concentração referentes às análises de nitrito e nitrato estão apresentados na Figura 4.29. Observa-se que tanto o nitrito quanto o nitrato foram detectados nas amostras retiradas do interior dos reatores logo após o enchimento (LA 4L e MBR 5L), indicando que o processo de nitrificação começa logo no início do ciclo. O nitrito foi raramente detectado nas amostras das saídas dos reatores e na amostra do interior do reator no momento final do ciclo (MBR 4L), o que indica a completa conclusão do segundo estágio da nitrificação, resultado este semelhante ao obtido por Racz, Muller e Goel (2012). Já o nitrato foi quantificado nestas amostras, indicando a não ocorrência do processo de desnitrificação, devido a ausência de uma etapa anaeróbia.

Figura 4.29 – Valores de concentração de nitrito (a, b) e nitrato (c, d) nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA (a, c) e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR (b, d).





Os valores médios de nitrato, encontrados nas amostras referentes a saída dos reatores, foram de $9,5 \pm 4,6$ mg/L para LA e $10,1 \pm 2,4$ mg/L para MBR, sendo que a concentração média de N-NH_4^+ no esgoto sintético foi de $29,3 \pm 4,4$ mg/L. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos por Chiellini et al. (2013) ($35,0 \pm 7,7$ mg/L de N-NH_4^+ no afluente, e $12,4 \pm 2,8$ mg/L e $11,0 \pm 3,1$ mg/L de N-NO_3^- , para o efluente dos reatores MBR e CAS, respectivamente).

Maeng et al. (2013), obtiveram valores de $37,6 \pm 0,9$ mg/L de nitrato e $0,2 \pm 0,02$ mg/L de nitrito para o permeado do reator MBR (TRS 20 d). Neste caso, os autores também verificaram a ocorrência apenas do processo de nitrificação.

As análises de fosfato foram iniciadas a partir do segundo mês de operação dos reatores. Os resultados desta variável são apresentados na Figura 4.30, em que se observou que os sistemas avaliados não foram eficientes para promover a remoção de tal composto, conforme esperado devido à ausência de uma fase anaeróbia durante a operação dos reatores. Maeng et al. (2013) também analisaram este parâmetro e constataram que não houve remoção de fosfato nas condições adotadas.

Os valores médios de eficiência de remoção de carbono orgânico dissolvido (COD), obtidos ao longo dos 120 dias de operação dos reatores, foram de $94,3 \pm 10,1\%$ para o reator LA e de $95,8 \pm 5,9\%$ para o reator MBR, com valores médios de COD nas amostras da saída dos reatores MBR e LA iguais a 9,3 e 11,4 mg/L, respectivamente. Já a amostra de esgoto sintético apresentou um valor médio de COD de $221,9 \pm 69,1$ mg/L. O perfil da concentração de COD encontrado nos reatores ao longo do tempo, e a eficiência de remoção, são apresentados na Figura 4.31.

Os resultados obtidos por Kellner (2014), com um reator MBR, mostraram uma eficiência de remoção de COD de $95,9 \pm 2,0\%$, sendo o valor médio obtido para a amostra do permeado de 7,5 mg/L, bastante semelhante aos valores obtidos neste estudo. Os valores de COD obtidos por Maeng et al. (2013) foram de $81,0 \pm 1,5$ mg/L para amostra de entrada e de $1,7 \pm 0,2$ mg/L para o permeado do reator MBR (TRS 20 d), sendo a eficiência de remoção igual a 97,9%.

Figura 4.30 – Valores de concentração de fosfato nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA (a) e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR (b).

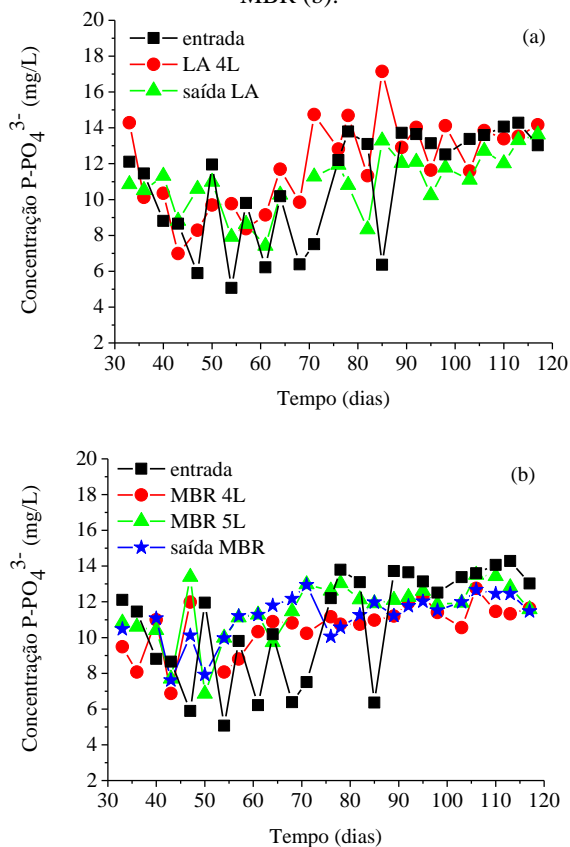
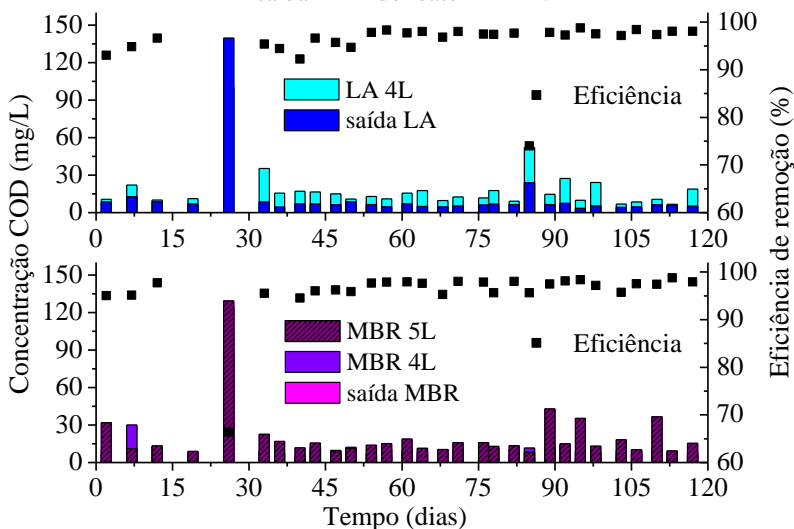


Figura 4.31 – Valores de concentração e eficiência de remoção de COD nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.



* Concentração de COD no esgoto sintético = $221,9 \pm 69,1$ mg/L.

4.5.2.2 Eficiência de remoção de hormônios

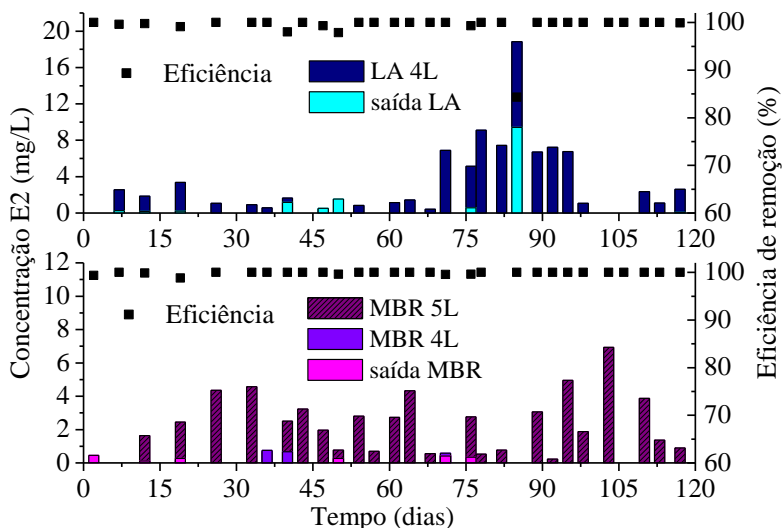
Os hormônios foram quantificados, em todos os pontos de coleta, para verificar o comportamento dos reatores na remoção destes compostos da fase líquida. Com relação ao composto 17β -estradiol (E2) (Figura 4.32), no reator LA os valores de eficiência de remoção estiveram compreendidos entre 84,3 e 100% sendo a média de $99,2 \pm 2,9\%$, o menor valor obtido foi o único abaixo de 97,0% de remoção. Para o reator MBR foi verificada uma eficiência média de remoção de $99,9 \pm 0,3\%$ de E2, e os valores estiveram compreendidos entre 98,8 e 100%. Sendo que para a amostra MBR 4L, após 3 h de aeração, os valores detectados foram inferiores a $0,8 \mu\text{g/L}$.

O comportamento do composto estrona (E1), ao longo dos 120 de operação dos reatores, pode ser visualizado na Figura 4.33. Durante a operação do reator LA, valores de eficiência de remoção de E1 foram verificados entre 78,8 e 100%, sendo que a eficiência média foi de 98,6

$\pm 4,3\%$, e a maioria dos resultados foi igual a 100%. Para o reator MBR, o valor médio de eficiência de remoção foi de $99,8 \pm 0,5\%$, e os valores estiverem compreendidos entre 97,4 e 100%. Sendo que para a amostra MBR 4L, após 3 h de aeração, os valores detectados foram inferiores a $1,6 \mu\text{g/L}$.

Como verificado nos ensaios cinéticos de bancada, apresentados na primeira etapa, o composto E2 é rapidamente convertido para E1, e ambos são degradados ao longo do processo de tratamento.

Figura 4.32 – Valores de concentração e eficiência de remoção de E2 nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.

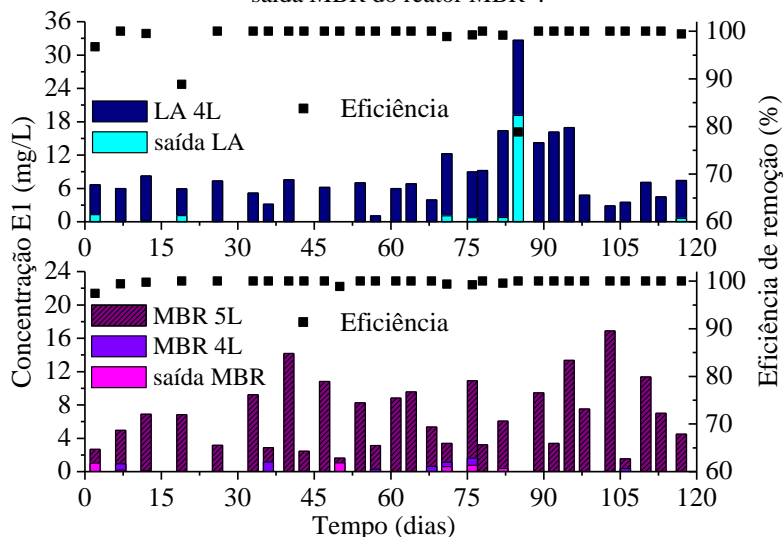


* Concentração de E2 no esgoto sintético = $73,7 \pm 15,7 \text{ mg/L}$.

O reator LA apresentou eficiência média de remoção do hormônio sintético 17α -etinilestradiol (EE2) superior a 91,0% (Figura 4.34). Já o reator MBR apresentou eficiência média de remoção superior a 83,0% para EE2. Os menores valores de eficiência foram obtidos no início do tratamento, sendo observada uma tendência de aumento da eficiência, ao longo do período operacional. A partir desta observação, é possível sugerir que durante o período inicial, onde os reatores foram

operados por três vezes o TRS, ocorreu a adaptação dos sistemas às novas condições impostas, no quarto mês de funcionamento, período em que a biomassa estava plenamente adaptada às condições, os valores de eficiência de remoção de hormônios foram mais elevados e mais estáveis. Estes resultados são confirmados pelos dados apresentados na Tabela 4.6.

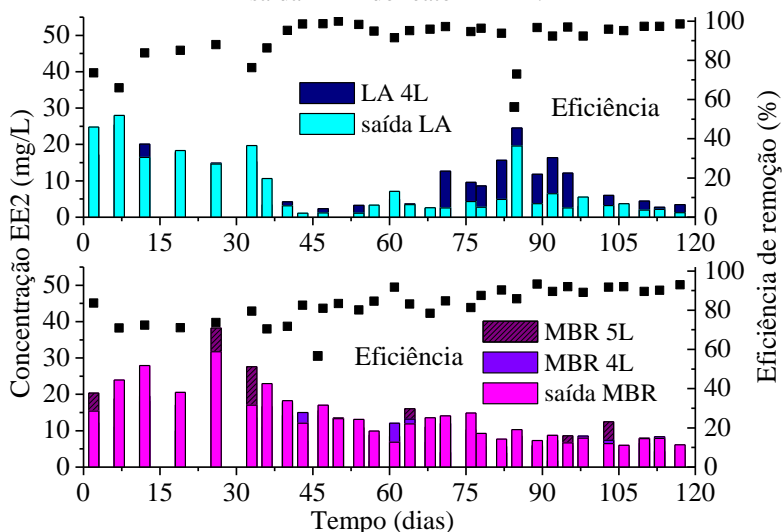
Figura 4.33 – Valores de concentração e eficiência de remoção de E1 nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.



* Concentração de E1 no esgoto sintético = $76,8 \pm 25,0$ mg/L.

Neste estudo foi verificado que o composto sintético EE2 foi mais persistente do que os compostos naturais em ambos os sistemas de tratamento avaliados. Devido às suas características químicas, como a presença de um grupo etinil, a degradação da molécula de EE2 é mais difícil do que das moléculas de E1 e E2 (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010). Estes resultados foram obtidos em vários estudos em que foi avaliada a remoção destes compostos em biorreatores (MAENG et al., 2013; PHOLCHAN et al., 2008; ESTRADA-ARRIAGA; MIJAYLOVA, 2011).

Figura 4.34 – Valores de concentração e eficiência de remoção de EE2 nas amostras LA 4L e saída LA do reator LA e nas amostras MBR 5L, MBR 4L e saída MBR do reator MBR*.



* Concentração de EE2 no esgoto sintético = $79,4 \pm 16,2$ mg/L.

Na Tabela 4.6 são apresentados os valores de eficiência média de remoção dos compostos, durante o período total de operação de ambos os reatores, e em dois períodos distintos (três primeiros meses e o último mês). Observa-se que no último mês de tratamento, a eficiência de remoção foi maior para todos os compostos, quando comparado com os valores obtidos para os três primeiros meses, sendo que um aumento mais pronunciado (aproximadamente 10,0% no reator MBR e 6,0% no reator LA) ocorreu para o composto sintético. Além disso, a remoção dos estrogênios naturais foi superior a 99,9% para o último mês de tratamento.

Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) avaliaram um reator MBR após funcionamento por um período de duas vezes o TRS de 60 d, e observaram uma mudança na taxa de biodegradação dos hormônios (E1, E2 e EE2) a partir do dia 135. Esta taxa aumentou de 8,0 a 45,0 ng/gSSV.d (até 120 d) para 170,0 a 195,0 ng/gSSV.d (após 135 d),

indicando que o principal processo envolvido na remoção dos estrogênios em MBRs é a biodegradação.

Tabela 4.6 – Eficiência média e desvio padrão de remoção dos estrogênios em diferentes períodos de operação dos reatores*.

Período	EE2 (%)	E1 (%)	E2 (%)
120 dias MBR	83,6 ± 7,4	99,8 ± 0,5	99,9 ± 0,3
1 – 90 d MBR	80,9 ± 6,9	99,7 ± 0,6	99,8 ± 0,3
91 – 120 d MBR	90,8 ± 1,4	100 ± 0,0	100 ± 0,0
120 dias LA	91,5 ± 8,8	98,7 ± 4,3	99,2 ± 2,9
1 – 90 d LA	89,9 ± 9,8	98,2 ± 4,9	98,9 ± 3,3
91 – 120 d LA	95,7 ± 2,3	99,9 ± 0,2	99,9 ± 0,03

*91 – 120 d corresponde ao período de operação superior a 3 vezes TRS.

A remoção quase completa de E2 nos reatores LA e MBR, obtida neste trabalho, também foi verificada por Pholchan et al. (2008), Zhou et al. (2011) e López-Fernández et al. (2013). Pholchan et al. (2008) observaram este resultado em um reator SBR operado em TRS de 1,7 a 17,1 d. Os autores concluíram que a remoção de E2 não foi, portanto, altamente dependente da composição da comunidade microbiana. Zhou et al. (2011) compararam dois sistemas, um MBR e um SBR (TRS = 10 d), e observaram que a eficiência de remoção de E2 foi superior a 95,0% em ambos os reatores. Já López-Fernández et al. (2013) obtiveram uma alta remoção de E2, superior a 99,0%, utilizando dois reatores, um MBR e um lodo ativado convencional (CAS). Fan et al. (2014) avaliaram o comportamento do composto E2, em um MBR, obtendo eficiência média de remoção de 90,0%.

Altos valores de eficiência de remoção de E1 e EE2 também foram obtidos por Zhou et al. (2011) em um reator MBR com TRS de 20 e 40 d, sendo a eficiência média de remoção de E1 de aproximadamente 90,0%, e superior a 90,0% para o composto EE2. Neste caso, a remoção de EE2 foi semelhante, e a remoção de E1 foi inferior, aos valores obtidos neste trabalho.

No trabalho realizado por Racz, Muller e Goel (2012), os autores avaliaram a remoção de E2 e EE2 em dois reatores SBR e obtiveram de 99,4% a 99,9% de remoção de ambos os estrogênios, ao longo dos experimentos em cada reator.

As análises realizadas nas amostras, MBR 4L e saída MBR, apresentaram valores de $0,07 \pm 0,21$ e $0,06 \pm 0,14$ $\mu\text{g/L}$ de E2; $0,21 \pm 0,44$ e $0,14 \pm 0,31$ $\mu\text{g/L}$ de E1; e $10,60 \pm 4,67$ e $13,22 \pm 6,76$ $\mu\text{g/L}$ de EE2, respectivamente. Provavelmente, o valor referente a concentração de EE2 mais alto na saída do reator, é atribuído ao fato de que a amostra do permeado é composta, ou seja, sua retirada se inicia após a primeira hora de aeração, e se estende por 3 h, ao longo do ciclo de tratamento do MBR.

Desta forma observa-se, pela proximidade dos valores obtidos nas amostras MBR 4L e saída MBR, que os compostos não foram retidos pela membrana, nem adsorvidos ao lodo aderido à superfície da membrana. Zhou et al. (2011) apresentaram resultados semelhante após a avaliação da concentração dos estrogênios em amostras do sobrenadante do reator MBR, para verificar a concentração dos compostos antes e depois de passar pela membrana.

Os resultados obtidos para os hormônios naturais apresentaram elevada eficiência de remoção. Esta remoção foi atribuída principalmente ao processo de biodegradação, sendo que provavelmente uma porção dos compostos é removida também por adsorção nas partículas de lodo. Estes resultados estão de acordo com as observações de Maeng et al. (2013). Estes autores observaram ainda um aumento na remoção de EE2 com o aumento do TRS de 8, 20 e 80 d, sendo que as eficiências de remoção foram de 39,5, 70,6 e 78,1%, respectivamente.

Valores de eficiência de remoção, inferiores aos obtidos neste estudo, foram verificados por Bagnall et al. (2012) (92,0% para $\Sigma\text{E1} + \text{E2} + \text{E3}$, e 75,0% para EE2) com um piloto CAS, Yang, Zhou e Cicek (2012) (89,0% de E2 e 70,9% de EE2) com um piloto MBR e Petrie et al. (2014) (41,0% de EE2) com um piloto de CAS. Esta diferença pode ser atribuída a fatores como: diferença entre as concentrações utilizadas por estes autores e a adotada neste estudo (foi utilizada uma concentração elevada devido às limitações analíticas); diferentes taxas de nitrificação; diferentes quantidades de microrganismos responsáveis por realizar a biodegradação dos compostos de interesse; diferentes condições operacionais como TRS e TDH; diferentes formas de operação dos sistemas, neste estudo os sistemas foram operados em batelada sequencial.

4.6 CONSIDERAÇÕES RELACIONADAS A EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE HORMÔNIOS NOS REATORES LA E MBR

De acordo com os resultados obtidos é possível dizer que estes foram condizentes com as propriedades dos compostos apresentadas na Tabela 2.1. Observou-se que para EE2 com K_{bio} entre 1 e 8 L/gSS.d a remoção esteve compreendida entre 80 e 96% utilizando os reatores aeróbios. Joss et al. (2006) concluíram que substâncias com K_{bio} entre 0,1 e 10 L/gSS.d devem ser parcialmente biodegradadas com eficiência de remoção de 20 a 90%. Já os hormônios naturais que apresentam K_{bio} entre 10 e 950 L/gSS.d foram removidos com uma porcentagem superior a 98% pelos reatores aeróbios. Segundo JOSS et al. (2006) para os compostos com K_{bio} superiores a 10 L/gSS.d espera-se uma degradação biológica acima de 90%, sendo esta dependente das configurações do reator.

Com relação aos processos de eliminação de DQO e nitrificação, verificou-se que ambos não apresentaram relação direta com a remoção de E2. Esta constatação também foi aplicada aos resultados obtidos por López-Fernández et al. (2013). Maeng et al. (2013) também constataram que a remoção dos hormônios naturais não é afetada pela nitrificação.

A temperatura de 25 ± 2 °C foi mantida durante todo o período de funcionamento dos sistemas. Hai et al. (2011) verificaram que a eficiência de remoção dos estrogênios, superior a 90,0% durante a operação de um MBR em 20 °C, foi mantida em temperaturas de 10 a 35 °C. Entretanto, a remoção foi significativamente reduzida em 45 °C, para E1 e EE2.

A partir do monitoramento dos sistemas LA e MBR, foi possível verificar o estabelecimento de condições estáveis para o crescimento de microrganismos especializados, capazes de remover compostos de difícil biodegradação. Os resultados revelaram a presença no lodo dos reatores, de uma comunidade bacteriana flexível e capaz de se adaptar às mudanças no ambiente em que estão inseridas (diferentes condições operacionais). Estas características são importantes para o bom desempenho de reatores no tratamento de esgoto, conforme também observado por Miura et al. (2007) e Molina-Muñoz et al. (2009).

A biodegradação, provavelmente, é o mecanismo dominante de remoção de estrogênios, observado nos reatores LA e MBR, operados

em batelada sequencial, durante todo o período de monitoramento. Com base nos resultados obtidos, e nas considerações apresentadas na literatura, é possível concluir que os compostos naturais são removidos com maior facilidade pelas bactérias presentes nos sistemas, do que o composto sintético. Além disso, o reator MBR, operado com baixa eficiência do processo de nitrificação (seção 4.4), apresentou elevada remoção dos hormônios naturais, portanto, conforme também verificado por Racz, Muller e Goel (2012), os microrganismos mais prováveis de serem responsáveis pela degradação de E2 e E1 foram os heterotróficos.

Neste trabalho, a eficiência média de remoção de EE2, obtida no reator MBR na ausência do processo de nitrificação (seção 4.4), foi de 65,1%. Portanto, os microrganismos responsáveis por esta remoção, foram os heterotróficos. Assim como neste estudo, Racz, Muller e Goel (2012) também observaram que as bactérias heterotróficas podem contribuir significativamente com a transformação de EE2. Os autores obtiveram estes resultados em testes realizados na presença de apenas microrganismos heterotróficos ativos.

Por outro lado o reator MBR, operado com eficiência de remoção de amônia superior a 99,0% (seção 4.5), apresentou eficiência de remoção de EE2, de $83,6 \pm 7,4\%$, durante todo o período operacional, sendo que este valor é ainda maior no último mês de monitoramento, $90,8 \pm 1,4\%$. Desta forma, foi verificado um aumento aproximado entre 11,1 e 27,1% de remoção de EE2, quando a nitrificação foi efetiva e provavelmente esta remoção foi mediada pelo processo de cometabolismo. Racz, Muller e Goel (2012) também observaram que a presença de bactérias nitrificantes contribuiu para uma remoção mais eficiente do composto EE2, sendo observado um aumento de 10,0 a 18,0%. Valor bastante semelhante ao verificado neste estudo.

Maeng et al. (2013) realizaram a inibição da atividade das bactérias AOB (nitrificação reduzida em 80,0%), e constataram que esta inibição afeta significativamente a eficiência de remoção de EE2, sendo verificada uma redução de 70,6% para menos de 10,0%. Já a adição de azida sódica, realizada com o objetivo de inibir a respiração aeróbia para suprimir a atividade microbiana da biomassa, promoveu uma redução substancial na eficiência de remoção dos compostos de 100% (E2 e E1), e 78,1% (EE2), para apenas 13,0, 23,0 e 6,9% para E2, E1 e EE2, respectivamente. Desta forma, os autores concluíram que os

microrganismos heterotróficos exercem um papel fundamental na remoção dos compostos E1, E2 e EE2. Apesar de não ter sido realizada tal inibição neste trabalho, também é possível supor que a remoção dos compostos foi realizada, em grande parte, por este grupo de microrganismos, devido à alta eficiência obtida no reator da seção 4.4, onde não foi verificada a ação dos microrganismos autotróficos.

Yi e Harper (2007a) observaram que o processo de nitrificação é acompanhado pela biodegradação de EE2, sendo ambos inibidos na presença de ATU. A biotransformação de EE2 pode ser cometabolicamente mediada em biorreatores que são enriquecidos com bactérias autotróficas nitrificantes. Por outro lado, os autores consideram que a presença de bactérias heterotróficas, microrganismos de rápido crescimento presentes em sistemas de lodos ativados, pode contribuir ou até mesmo dominar a transformação de micropoluentes. Os microrganismos nitrificantes podem inicialmente degradar EE2 em intermediários, e estes podem ser consumidos pelas bactérias heterotróficas.

Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) também observaram que o processo de nitrificação está diretamente relacionado com a remoção dos hormônios. Os autores observaram que o aumento nas taxas de nitrificação e de remoção de E1, E2 e EE2 são diretamente proporcionais.

Desta forma, considerando os trabalhos de Racz, Muller e Goel (2012), Maeng et al. (2013), Yi e Harper (2007a) e Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011) é possível considerar que, nas condições adotadas, o desempenho dos sistemas de tratamento é afetado pela presença das bactérias nitrificantes. Entretanto, a presença das bactérias heterotróficas é crucial para a remoção dos estrogênios e de outros compostos de elevado interesse ambiental.

Através das análises respirométricas foi determinada a taxa de consumo de oxigênio, realizada tanto por bactérias autotróficas como por bactérias heterotróficas. Observou-se que as bactérias autotróficas apresentaram atividade elevada, resultado este corroborado pelos valores de amônia, nitrito e EE2 obtidos nas amostras do permeado e do sobrenadante dos reatores, MBR e LA, respectivamente. A presença das bactérias heterotróficas também foi bastante significativa, sendo que

este resultado também é confirmado pelas altas eficiências de remoção, apresentadas pelos reatores em nível de DQO e hormônios.

Larcher e Yargeau (2013) observaram que a remoção de EE2 pode ser obtida na presença de bactérias heterotróficas, tanto fazendo uso de uma bactéria única quanto na presença de um grupo de bactérias. Além disso, os autores observaram que uma mesma bactéria não apresenta o mesmo comportamento nestes dois casos.

Em oposição ao verificado até o momento os autores Bagnall et al. (2012) realizaram ensaios sem a presença de amônia, com conseqüente redução na quantidade de AOB, e observaram que a remoção dos estrogênios não foi afetada por tal condição, incluindo EE2. Petrie et al. (2014) observaram que a inibição do processo de nitrificação (adição de ATU) não teve qualquer impacto na biodegradação dos estrogênios. Estes autores concluíram que, nas condições estabelecidas, as reações enzimáticas que seguem a oxidação da amônia (oxidação de nitrito) não contribuem para a biodegradação dos estrogênios. Os autores sugerem que a ação das bactérias heterotróficas é significativa na biodegradação destes compostos.

Observa-se, portanto, que o tema de remoção de hormônios em processos biológicos de tratamento de esgoto apresenta divergências significativas entre os trabalhos realizados. Isto ocorre devido, principalmente, a dinâmica envolvida nestes processos, onde pequenas variações em condições operacionais ou ambientais são responsáveis por causar diferenças nas respostas obtidas em cada estudo.

5 CONCLUSÕES

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

Conclusões da primeira etapa:

Os resultados obtidos para esta etapa demonstraram a confirmação da hipótese formulada. Observou-se que a eficiência na degradação de hormônios diferiu em função das diferentes condições operacionais introduzidas em um sistema de tratamento, conforme conclusões detalhadas descritas a seguir:

- A concentração de E2 foi rapidamente reduzida pelo lodo ativado em todas as condições consideradas. Sendo observada a oxidação de E2 para E1;
- Quando foi utilizado o lodo inativado, EE2 teve a maior remoção, provavelmente devido à adsorção de EE2 no lodo;
- E1 e EE2 foram mais facilmente removidos da fase aquosa, quando elevados teores de SSV e concentrações de metanol estavam presentes e quando o meio sintético, rico em amônia, foi utilizado;
- A adsorção dos estrogênios sobre o lodo pode contribuir para a sua remoção da fase aquosa (remoção de 76,7% de E1; 81,5% de E2 e 94,0% de EE2 após 24 h de ensaio);
- A remoção do estrogênio sintético, EE2, foi mais difícil, mas também ocorreu por adsorção no lodo e/ou por cometabolismo;
- As amostras de lodos ativados provenientes da mesma ETE, porém coletadas em diferentes dias, apresentaram comunidades bacterianas similares;
- O lodo inativado, obtido através de autoclavagem, resultou numa semelhança de menos de 50,0% em relação ao lodo ativado;
- A biodegradação aeróbia, que ocorre em sistemas convencionais, como lodos ativados, é um importante mecanismo para atenuar os hormônios de águas residuais domésticas (principalmente hormônios naturais). A eficiência deste mecanismo depende das condições operacionais, que são favorecidas na presença de fontes de carbono e de amônia, quando se trata da remoção de E1 e EE2.

Conclusões da segunda etapa:

A partir da operação do reator de enriquecimento foi possível verificar que a hipótese formulada é verdadeira. A presença de hormônios,

como principal fonte de carbono externa, em reatores biológicos, possibilitou o desenvolvimento de microrganismos específicos, capazes de realizar a degradação destes compostos. Especificamente, algumas conclusões podem ser feitas:

- As bactérias aeróbias, selecionadas no reator de enriquecimento, têm uma elevada capacidade para degradar os hormônios naturais, E1 e E2;
- As bactérias aeróbias não foram capazes de remover do reator de enriquecimento o hormônio sintético, EE2, quando os hormônios naturais estavam presentes;
- Na presença dos hormônios, as bactérias mais adaptadas foram selecionadas e permaneceram no reator por um longo período de tempo;
- As bactérias aeróbias que permaneceram no reator de enriquecimento podem usar os hormônios naturais como fonte de carbono e energia para seu crescimento;
- Observou-se o acúmulo do hormônio sintético EE2 no reator, pois as bactérias não foram capazes de assimilar tal composto recalcitrante;
- Depois de trinta dias de funcionamento do reator, o número de bandas, identificadas pela análise de PCR-DGGE, foi menor em comparação com o primeiro mês de operação. Isso pode indicar que a solução de alimentação foi apropriada para selecionar um grupo de bactérias heterotróficas capazes de degradar hormônios naturais (E1 e E2).

Conclusões da terceira etapa:

- A prévia operação do biorreator a membrana deu subsídio para entender melhor o funcionamento do sistema;
- O piloto de MBR utilizado no tratamento de esgoto sintético apresentou eficiência de remoção dos hormônios de 98,4, 99,6 e 65,1% para E1, E2 e EE2, respectivamente, confirmando a potencialidade de tal sistema para o tratamento de esgotos com foco na remoção destes compostos;
- Foi verificada baixa eficiência de remoção de amônia no sistema de tratamento avaliado, indicando a necessidade de aprimorar tal remoção. Provavelmente esta melhoria irá aumentar a eficiência de remoção de EE2, pois observou-se que esta remoção está diretamente relacionada à

eficiência do processo de nitrificação e ação das bactérias autotróficas, devido a ocorrência do processo de cometabolismo;

- Observou-se que o inóculo do sistema não possuía a presença, em quantidades adequadas, de microrganismos nitrificantes, bem como a composição do esgoto sintético não foi apropriada, pois apresentou baixos valores de pH, ocasionando valores reduzidos no interior do reator. Ambos os casos são responsáveis pela baixa eficiência de remoção de amônia observada. Desta forma, verificou-se a necessidade de substituir tais condições para possibilitar a ocorrência do processo de nitrificação e conseqüentemente o aumento da eficiência de remoção do composto sintético EE2 através do processo de cometabolismo.

Conclusões da quarta etapa:

Após o monitoramento de dois sistemas piloto de tratamento de esgoto, constatou-se que tanto o biorreator a membrana quanto o reator de lodos ativados, ambos operados em batelada sequencial, foram capazes de promover a retenção e o desenvolvimento de bactérias degradadoras de hormônios. Portanto a hipótese de que o MBR seria mais eficiente não foi confirmada. As principais conclusões obtidas são apresentadas a seguir:

- Os reatores MBR e LA apresentaram resultados bastante satisfatórios em termos de remoção das variáveis físico-químicas e de hormônios;
- Observou-se que a existência do processo de nitrificação é crucial para a eliminação de EE2 do esgoto doméstico, pois permite a ocorrência do processo de cometabolismo;
- A eficiência de remoção dos hormônios naturais (E1 e E2) foi superior a 98% em ambos os reatores, durante todo o período operacional de 120 dias. Já o composto sintético (EE2) foi removido com uma eficiência de $90,8 \pm 1,4\%$ pelo reator MBR e de $95,7 \pm 2,3\%$ pelo reator LA, no último mês de monitoramento, após a operação do reator por três vezes a idade do lodo de 30 dias;
- Não foram observadas diferenças significativas relacionadas à eficiência dos reatores, em termos de remoção das variáveis avaliadas, devido às diferenças operacionais existentes em cada sistema;

-
- O sistema de lodos ativados operado em batelada sequencial demonstrou ser tão eficiente quanto um biorreator a membrana também operado em batelada sequencial;
 - A elevada eficiência obtida no sistema LA foi possível devido à presença de um sistema de separação entre sólidos e líquidos que permitiu a retirada apenas do líquido sem provocar a perda dos sólidos, permitindo a total retenção dos mesmos no sistema. Desta forma, a principal vantagem atribuída aos sistemas MBR foi conseguida em um reator de lodos ativados bem operado em batelada sequencial.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificar os microrganismos que apresentaram capacidade em degradar os hormônios;
- Realizar o estudo da genômica dos microrganismos presentes em reatores que apresentam elevada capacidade de degradação de hormônios por comparação;
- Avaliar menores concentrações de hormônios, para possibilitar a direta extrapolação dos resultados obtidos para um ambiente real;
- Monitorar a presença de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto, para verificar a ocorrência dos principais compostos, bem como a quantidade excretada e a eficiência obtida em diferentes processos;
- Realizar o estudo de biodegradação dos compostos juntamente com a identificação de intermediários e avaliar o potencial poluidor dos subprodutos gerados;
- Avaliar a quantidade de hormônios adsorvidos ao lodo dos reatores para possibilitar a realização de um balanço de massa no sistema de tratamento;
- Avaliar a toxicidade do efluente gerado em sistemas de tratamento biológico objetivando a remoção de micropoluentes;
- Realizar o estudo da remoção do residual de hormônios obtido no efluente tratado a partir de processos oxidativos avançados.

6 REFERÊNCIAS

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele”.

Immanuel Kant

AMARAL, P. A. P. et al. Association of dissolved air flotation (DAF) with microfiltration for cyanobacterial removal in water supply. **Desalination and water treatment**, v. iFirst, p. 1-8, 2012.

ANDRADE, J. F. **Pós Tratamento de Efluentes Sanitários Através de Membranas**. 2001. 95 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 21 Ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.18, n. 3, p. 187-204, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12209**: Elaboração de projetos hidráulico-sanitários de estações de tratamento de esgotos sanitários. Rio de Janeiro, 2011. 53 p.

Australian Guidelines for Water Recycling: Managing Health and Environmental Risks (Phase 2) - Augmentation of Drinking Water Supplies. National Health and Medical Research Council / Natural Resource Management Ministerial Council, 2008.

BAGNALL, J. P. et al. Resource dependent biodegradation of estrogens and the role of ammonia oxidising and heterotrophic bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 239-240, p. 56-63, 2012.

BASILE, T. et al. Review of Endocrine-Disrupting-Compound Removal Technologies in Water and Wastewater Treatment Plants: An EU Perspective. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 14, p. 8389-8401, 2011.

BELLI, T. J. et al. Total nitrogen removal in membrane sequencing batch bioreactor treating domestic wastewater. **Acta Scientiarum Technology**, v. 36, p. 221-227, 2014a.

BELLI, T. J. et al. Biological nutrient removal in a sequencing batch membrane bioreactor treating municipal wastewater. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, p. 1-8, 2014b.

BELLI, T. J. et al. Biorreator à membrana em batelada sequencial aplicado ao tratamento de esgoto visando à remoção de nutrientes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.17 n.2, p. 143-154, 2012.

BELLI, T. J. **Biorreator à membrana em batelada sequencial aplicado ao tratamento de esgoto visando a remoção de nitrogênio total**. 2011. 170 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BENTO, A. P. et al. Caracterização da microfauna em estação de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 329-338, 2005.

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

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

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. London, UK: CRC Press LLC, 2003. 310 p.

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

BOON, N. et al. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 101-112, 2002.

BOUGRIER, C.; DELGENÈS, J. P.; CARRÈRE, H. Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. **Chemical Engineering Journal**, v. 139, p. 236-244, 2008.

BRANDT, E. M. F. et al. Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 718–26, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2914, de 12 de dezembro de 2011.

CALDAS, S.S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAMPELLO, F. **Nitrificação e Pré-desnitrificação em Sistema de Tratamento de Esgoto Sanitário Utilizando Biorreator à Membrana Submersa Visando Reúso**. 2009. 117 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARBALLA, M. et al. Determination of the solid–water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. **Water Research**, v. 42, p. 287–295, 2008.

CASES, V. et al. Endocrine disrupting compounds: A comparison of removal between conventional activated sludge and membrane bioreactors. **Desalination**, v. 272, p. 240–245, 2011.

CASTRO, C. M. B. Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, n. 1, p. 4-5, 2002.

CHANG, H. S. et al. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 1-12, 2009.

CHANG, S. et al. Fate and transport of endocrine-disrupting compounds (oestrone and 17 β -oestradiol) in a membrane bio-reactor used for water re-use. **Water Science and Technology**, v. 53, p. 123-30, 2006.

CHEN, X.; HU, J. Adsorption of Natural Estrogens and Their Conjugates by Activated Sludge. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p. 251-61, 2010.

CHIELLINI, C. et al. Characterization and Comparison of Bacterial Communities Selected in Conventional Activated Sludge and Membrane Bioreactor Pilot Plants: A Focus on Nitrospira and Planctomycetes Bacterial Phyla. **Current Microbiology**, v. 67, p. 77–90, 2013.

CIRJA, M. et al. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). **Environ Sci Biotechnol**, v. 7, p. 61-78, 2008.

CLARA, M. et al. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 39, n. 19, p. 4797-4807, 2005.

CLARA, M. et al. Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol to sewage sludge. **Chemosphere**, v. 56, p. 843-851, 2004b.

CLOUZOT, L. **Etude du bioréacteur à membrane pour l'élimination de l'hormone synthétique 17 α -éthynylestradiol**. 2009. 236 f.. Tese

(Doutorado em Sciences de l'environnement) - Faculté des Sciences et Techniques, Université Paul Cézanne Aix Marseille, Marseille.

COLEMAN, H. M. et al. Assessment of Trace Organic Chemical Removal by a Membrane Bioreactor Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry and a Yeast Screen Bioassay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2537-2545, 2009.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1671-1692, 2010.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de março de 2005.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 430 de 13 de maio de 2011.

CORAL, L. A. **Remoção de cianobactérias e cianotoxinas em águas de abastecimento pela associação de flotação por ar dissolvido e nanofiltração**. 2009. 198 p. (Mestre em Engenharia Ambiental). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CORAL, L. A. et al. Nanofiltration membranes applied to the removal of saxitoxin and congeners. **Desalination and water treatment**, v. 27, p. 8-17, 2011.

CORDEIRO, D. et al. HPLC determination of hormones in São José do Rio Preto municipal dam, São Paulo, Brazil. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, n. 35, p. 2685–2695, 2012.

D'ASCENZO, G. et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **Science of the Total Environment**, v. 302, n. 1-3, p. 199-209, 2003.

DENECKE, M. et al. Molecular identification of the microbial diversity in two sequencing batch reactors with activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1725–1734, 2012.

DESMIARTI, R.; LI, F. Behavior of Natural Estrogens in Activated Sludge: Biodegradation in Semicontinuous Reactor under Aerobic, Anaerobic and Sequential Anaerobic/Aerobic Conditions. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, v. 45B, n. 2, 2013.

DIALYNAS, E.; DIAMADOPOULOS, E. The effect of biomass adsorption on the removal of selected pharmaceutical compounds in an immersed membrane bioreactor system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 232-37, 2012.

DURIGAN, M. A. et al. Degradação de poluentes emergentes por processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 35, p. 1381-1387, 2012.

EPA – United States Environmental Protection Agency. **EPA Risk Assessment**. Glossary. Disponível em: <http://www.epa.gov/risk_assessment/glossary.htm>. Acesso em: 10 novembro 2014.

ESPERANZA, M. et al. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. **Chemosphere**, v. 66, p. 1535–1544, 2007.

ESTRADA-ARRIAGA, E. B.; MIJAYLOVA, P. N. 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, n. 7, p. 1121-1128, 2011.

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

EVANS, F. F. et al. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **Fems Microbiology Ecology**, v. 49, n. 2, p. 295-305, 2004.

FALONE, S. Z. **Desenvolvimento de métodos para determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros**. 2007. 155 f.. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

FAN, H. et al. Contribution of sludge adsorption and biodegradation to the removal of five pharmaceuticals in a submerged membrane bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 101–107, 2014.

FENG, Y. et al. Adsorption behavior of EE2 (17 α -ethinylestradiol) onto the inactivated sewage sludge: Kinetics, thermodynamics and influence factors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 970-976, 2010.

FERNANDES, H. et al. Full-scale sequencing batch reactor (SBR) for domestic wastewater: Performance and diversity of microbial communities. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 262-68, 2013.

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

FUJII, K. et al. Degradation of 17 beta-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 2057-2060, 2002.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas; Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila), 1999.

GAULKE, L. S. et al. Estrogen Biodegradation Kinetics and Estrogenic Activity Reduction for Two Biological Wastewater Treatment Methods. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 18, p. 7111-7116, 2009.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GUNNARSSON, L. et al. 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, p. 5235–5242, 2009.

GUSSEME, B. et al. Biological removal of 17 alpha-ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor. **Water Research**, v. 43, n. 9, p. 2493-2503, 2009.

HAI, F. I. et al. Removal of micropollutants by membrane bioreactor under temperature Variation. **Journal of Membrane Science**, v. 383, p. 144– 151, 2011.

HAIYAN R. Y. et al. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 alpha-ethinylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. **Chemosphere**, v. 66, p. 340-346, 2007.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water research**, v. 46, p. 5813-33, 2012.

HASHIMOTO, T. et al. Contribution of the Estrogen-Degrading Bacterium *Novosphingobium* sp. Strain JEM-1 to Estrogen Removal in Wastewater Treatment. **Journal of Environmental Engineering**, v. 136, p. 890-896, 2010.

HASHIMOTO, T.; MURAKAMI, T. Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments. **Water Research**, v. 43, p. 573-82, 2009.

HECKER, M.; HOLLERT H. Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, p. 1-15, 2011.

HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 109-118, 1999.

HOFFMANN, H. Caracterização do funcionamento de ETE de tipo lodo ativado via imagem microscópica - estudo na região da grande Florianópolis. In: XI SILUBESA - SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2004, Natal. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2004.

HU, J. Y. et al. Fate of endocrine disrupting compounds in membrane bioreactor systems. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 11, p. 4097-4102, 2007.

JIANG, L. Y.; YANG, J.; CHEN, J. M. Isolation and characteristics of 17 beta-estradiol-degrading *Bacillus* spp. strains from activated sludge. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 729-736, 2010.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, n. 2-3, p. 163-173, 2000.

JOHNSON, A. C.; SUMPTER, J. P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 24, p. 4697-4703, 2001.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 4 ed. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 2005. p.

JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 691-699, 2000.

JOSS, A. et al. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 11, p. 3047-3055, 2004.

JOSS, A. et al. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. **Water Research**, v. 40, p.1686-1696, 2006.

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

KAMEL A.; PRAKASH C. High Performance Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization/Tandem Mass Spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in Drug Metabolism and Toxicology. **Current Drug Metabolism**, v. 7, p. 837-852, 2006.

KELLNER, R. L. **Biorreator à membrana de leito móvel em bateladas sequenciais para a remoção de nutrientes e matéria orgânica de efluentes sanitários**. 2014. 146 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KOH, Y. K. K. et al. Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. **Environmental Technology**, v. 29, n. 3, p. 245-267, 2008.

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, p. 997-1003, 2009.

LAPOLLI, F. R. **Biofiltração e Microfiltração Tangencial Para Tratamento de Esgotos Sanitários**. 1998. 186 f.. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LARCHER, S.; YARGEAU, V. Biodegradation of 17 α -ethinylestradiol by heterotrophic bacteria. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 17-22, 2013.

LEE, J. et al. Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes. **Chemosphere**, v. 71, n. 8, p. 1582-1592, 2008.

LESJEAN, B. et al. Ten persistent myths and the realities of membrane bioreactor technology for municipal applications, **Water Science & Technology**, v. 63.1, p. 32-39, 2011.

LI, F. et al. Aerobic batch degradation of 17 β -estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures. **Water Research**, v. 39, p. 2065-75, 2005.

LI, F. et al. Behavior of natural estrogens in semicontinuous activated sludge biodegradation reactors. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2964-2971, 2008.

LI, Z. et al. Proteomic Analysis of 17 β -Estradiol Degradation by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 5947–5955, 2012.

LI, Z. J. et al. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. **Chemosphere**, v. 62, n. 8, p. 1374-1380, 2006.

LIANG, Z. et al. Biomass characteristics of two types of submerged membrane bioreactors for nitrogen removal from wastewater. **Water Research**, v. 44, p. 3313–3320, 2010.

LIMA, D. R. S. et al. Avaliação da remoção de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 783-788, 2014a.

LIMA, D. R. S. et al. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from natural waters by clarification associated with adsorption on powdered activated carbon. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 225, p. 103-108, 2014b.

LINDBLOM, E. et al. Dynamic experiments with high bisphenol-A concentrations modelled with an ASM model extended to include a separate XOC degrading microorganism. **Water Research**, v. 43, n. 13, p. 3169-3176, 2009.

LIU, Z.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 731-748, 2009.

Liz, M. V. **Estudo da potencialidade da fotocatalise heterogênea (TiO₂ e ZnO) e dos processos fenton para remediação de águas contaminadas pelos estrogênios estrona, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol**. 2013. 197 f.. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LIZ, M. V.; NAGATA N.; ZAMORA P. Considerações sobre o preparo de amostras contendo micropoluentes estrogênicos. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1213-1215, 2012.

LOPES, L. G. et al. Hormônios Estrogênicos no Ambiente e Eficiência das Tecnologias de Tratamento para Remoção em Água e Esgoto. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 13 n. 4, p. 123-131, 2008.

LOPES, L. G. et al. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Removal of 17- β estradiol from wastewater: comparison between a laboratory scale conventional activated sludge and a membrane bioreactor. **Desalination and Water Treatment**, v. 51, p. 2336–2342, 2013.

LUXMY, B. S.; NAKAJIMA, F.; YAMAMOTO, K. Analysis of bacterial community in membrane-separation bioreactors by fluorescent in situ hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 10-11, p. 259-268, 2000.

MAENG, S. K. et al. Influences of solid retention time, nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors. **Water Research**, v. 47, p. 3151–3162, 2013.

MAESTRI, R. S. **Biorreator à Membrana como Alternativa para o Tratamento de Esgotos e Reúso de Água**. 2007. 101 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAJONE, M. et al. Enrichment of activated sludge in a sequencing batch reactor for polyhydroxyalkanoate production. **Water Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 119-128, 2006.

MARINHO, B. A. et al. TiO₂ and ZnO mediated photocatalytic degradation of E2 and EE2 estrogens. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, p. 678-683, 2013.

MARTI, E. J.; BATISTA, J. R. Impact of secondary treatment types and sludge handling processes on estrogen concentration in wastewater sludge. **Science of the Total Environment**, v. 470-471, p. 1056-1067, 2014.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering - Treatment and Reuse**. 4 ed. New York: Mc Graw Hill, 2003. 1819 p.

MIURA, Y. et al. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. **Water Research**, v. 41, p. 627-37, 2007.

MOLINA-MUÑOZ, M. et al. Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3994–4003, 2009.

MONSALVO, V. M.; SHANMUGAM, P.; HORAN N. J. Application of microbial indices to assess the performance of a sequencing batch reactor and membrane bioreactor treating municipal wastewater. **Environmental Technology**, iFirst, p. 1–6, 2012.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.8, p. 1452–1462, 2011.

MORAES, N. V. et al. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2008.

MOREIRA, D. S. et al. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental Technology**, v. 30, n. 10, p. 1041-1049, 2009.

MOREIRA, M. A. et al. Determination of endocrine disrupting compounds in waters from Rio das Velhas Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF). **Environmental Technology**, v. 32, n. 11-12, p. 1409-1417, 2011.

MULLER, M. et al. Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 691-701, 2010.

O'GRADY, D.; EVANGELISTA, S.; YARGEAU, V. Removal of Aqueous 17 α -Ethinylestradiol by Rhodococcus Species **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 9, p. 1393-1400, 2009.

UNEP-WHO (United Nations Environment Programme - World Health Organization). **State of the science of endocrine disruptors**, 2012.

OTAWA, K. et al. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1985–1996, 2006.

PAUWELS, B. et al. 17 alpha-ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 beta-estradiol and estriol. **Biodegradation**, v. 19, n. 5, p. 683-693, 2008b.

PELEGRIN, D. C. **Microfiltração tangencial de efluente sanitário após tratamento biológico**. 2004. 131 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PESSOA, G. P. et al. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, n. 5, 968-973, 2012.

PESSOA, G. P. et al. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288–295, 2014.

PETRIE, B. et al. Diagnostic investigation of steroid estrogen removal by activated sludge at varying solids retention time. **Chemosphere**, v. 113, p. 101–108, 2014.

PHOLCHAN, P. et al. Fate of estrogens during the biological treatment of synthetic wastewater in a nitrite-accumulating sequencing batch reactor. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 16, p. 6141-6147, 2008.

PINHATI, F. R. **Caracterização molecular da população bacteriana do lodo de Refinaria de Petróleo por PCR-DGGE e RAPD**. 2008. 118 f.. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PROVENZI, G. **Biorreator à membrana submersa para tratamento biológico de efluentes: estudos hidrodinâmicos e físico-químicos no controle da colmatação**. 2005. 154 f.. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

QUEIROZ, F. B. et al. Determination of Endocrine Disrupters and Pharmaceuticals in Sewage Samples by Tandem Solid Phase Clean up/Extraction and High Performance Liquid Chromatography-Negative and Positive Electrospray High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 298-312, 2014.

QUEIROZ, F. B. et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. **Water Science and Technology**, v. 66, p. 2562-2569, 2012.

RACZ, L.; GOEL R. K. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, p. 58–70, 2010.

RACZ, L.; MULLER, J. G.; GOEL, R. K. 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, p. 35–42, 2012.

RADJENOVIC, J., PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Analysis of Pharmaceuticals in Wastewater and Removal Using a Membrane Bioreactor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1365-1377, 2007.

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

REN, Y. X. et al. Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. **Water Research**, v. 41, n. 14, p. 3089-3096, 2007b.

REN, Y. X. et al. A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process. **Water Research**, v. 41, p. 2341-48, 2007a.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. et al. Development and validation of a HPLC-DAD method for determination of several endocrine disrupting compounds in estuarine water. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 18, p. 2729-2746, 2007.

ROH, H. K. **Deciphering active estrogen-degrading microorganisms in bioreactors**. 2009. 121 f. Tese (Doctor of Philosophy). Civil Engineering, Texas A&M University, Texas.

ROH, H.; CHU, K. H. Effects of solids retention time on the performance of bioreactors bioaugmented with a 17 beta-estradiol-utilizing bacterium, *Sphingomonas* strain KC8. **Chemosphere**, v. 84, n. 2, p. 227-233, 2011.

ROH, H.; CHU, K.-H. A 17alpha-Estradiol-utilizing Bacterium, *Sphingomonas* Strain KC8: Part I - Characterization and Abundance in Wastewater Treatment Plants. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 13, p. 4943-4950, 2010.

SABIA, G.; FERRARIS, M.; SPAGNI, A. Effect of solid retention time on sludge filterability and biomass activity: Long-term experiment on a pilot-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 221, p. 176-184, 2013.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas Filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reúso**. 1 ed. São Paulo: ABES, 2001. 235 p.

SHI, J. et al. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2323-2330, 2004.

SHI, J. et al. 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, p. 107-14, 2013.

SHI, J. H. et al. Isolation and characterization of the ethynylestradiol-biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. **Water Science and Technology**, v. 45, n. 12, p. 175-179, 2002.

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

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

SKOTNICKA-PITAK, J. et al. Identification of the transformation products of 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-estradiol by mass spectrometry and other instrumental techniques. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1036-1052, 2008.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 92-98, 2010.

SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP,

Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.

STEPHENSON, T. et al. **Membrane Bioreactors for wastewater treatment**. Londres: IWA publishing, 2000. 179 p.

SUIDAN, M. T. et al. Challenges in biodegradation of trace organic contaminants - Gasoline oxygenates and sex hormones. **Water Environment Research**, v. 77, n. 1, p. 4-11, 2005.

SUN, D. D.; HAY, C. T.; KHOR, S. L. Effects of hydraulic retention time on behavior of start-up submerged membrane bioreactor with prolonged sludge retention time. **Desalination**, v. 195, p. 209-225, 2006.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 81-90, 1999.

TERNES, T. A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 91-99, 1999.

TRINH, T. et al. Removal of trace organic chemical contaminants by a membrane bioreactor. **Water Science Technology**, v. 66, n. 9, p. 1856-1863, 2012.

URASE, T.; KIKUTA, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. **Water Research**, v. 39, p. 1289-1300, 2005.

VADER, J. S. et al. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. **Chemosphere**, v. 41, n. 8, p. 1239-1243, 2000.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837-1842, 2010.

VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**: Lodos ativados. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. 428 p. Volume 4.

WANG, Z. et al. Recent advances in membrane bio-technologies for sludge reduction and treatment. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1187–1199, 2013.

WEBER, S. et al. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 106-112, 2005.

WIJEKOON, K. C. et al. The fate of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters and pesticides during MBR treatment. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 247–254, 2013.

WINTGENS, T.; GALLENKEMPER, M.; MELIN, T. Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. **Desalination**, v. 146, n. 1-3, p. 387-391, 2002.

WISZNIOWSKI, J.; ZIEMBINSKA, A.; CIESIELSKI, S. Removal of petroleum pollutants and monitoring of bacterial community structure in a membrane bioreactor. **Chemosphere**, v. 83, n. 1, p. 49-56, 2011.

XU, K.; HARPER, W. F. J.; ZHAO, D. 17 α -Ethinylestradiol sorption to activated sludge biomass: Thermodynamic properties and reaction mechanisms. **Water Research**, v. 42, p. 3146-3152, 2008.

YANG, W. **Investigation of endocrine disrupting compounds in membrane bioreactor and UV processes**. 2009. 171 f. Tese (Doctor of

Philosophy). Department of Biosystems Engineering, University of Manitoba, Winnipeg, Canada.

YANG, W.; ZHOU, H.; CICEK, N. Removal mechanisms of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in membrane bioreactors. **Water Science Technology**, v. 66, n. 6, p. 1263-1269, 2012.

YI, T. et al. Role of Particle Size and Ammonium Oxidation in Removal of 17 β -Ethinyl Estradiol in Bioreactors. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 11, p. 1527-1529, 2006.

YI, T.; HARPER, W. F. J. The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17 α -ethinylestradiol. **Water Research**, v. 41, p. 1543-1553, 2007b.

YI, T.; HARPER, W. F. Jr. The Link between Nitrification and Biotransformation of 17 α -Ethinylestradiol. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 4311-4316, 2007a.

YOSHIMOTO, T. et al. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5283-5289, 2004.

YU, C. P.; ROH, H.; CHU, K. H. 17 beta-estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 2, p. 486-492, 2007.

YU, C. P.; RULA, A. D.; KUNG-HUI, C. Microbial degradation of steroidal estrogens. **Chemosphere**, v. 91, p. 1225-35, 2013.

ZENG, Q. L. et al. Sorption and Biodegradation of 17 beta-Estradiol by Acclimated Aerobic Activated Sludge and Isolation of the Bacterial Strain. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 4, p. 783-790, 2009.

ZHANG, B. et al. Population dynamic succession and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in a membrane bioreactor treating municipal wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 796–803, 2009.

ZHANG, H-M. et al. Comparison between a sequencing batch membrane bioreactor and a conventional membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 87–95, 2006.

ZHANG, Z. H. et al. Comparing the adsorption and desorption characteristics of 17 α -ethinylestradiol on sludge derived from different treatment units. **International Journal of Environment Science and Technology**, v. 9, p. 247-56, 2012.

ZHOU N. A. et al. Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment. **Biodegradation**, v. 24, p. 813–827, 2013.

ZHOU, H. et al. Fate and removal of selected endocrine-disrupting compounds in sewage using activated sludge treatment. **Water and Environment Journal**, v. 26, p. 435–444, 2012.

ZHOU, K. et al. Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 482–486, 2008.

ZHOU, Y. et al. Removal of typical endocrine disrupting chemicals by membrane bioreactor: in comparison with sequencing batch reactor. **Water Science Technology**, v. 64, n. 10, p. 2096-2102, 2011.

ZUEHLKE, S. et al. Long-term comparison of trace organics removal performances between conventional and membrane activated sludge processes. **Water Environment Research**, v. 78, n. 13, p. 2480-2486, 2006.