

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Lícia Murito de Paula

Avaliação da Remoção dos Hormônios Estrogênicos 17β - estradiol e 17α - etinilestradiol no Esgoto por meio de um Reator em Batelada Sequencial

Rio de Janeiro

2022

Lícia Murito de Paula

Avaliação da Remoção dos Hormônios Estrogênicos 17β - estradiol e 17α - etinilestradiol no Esgoto por meio de um Reator em Batelada Sequencial

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira.

Rio de Janeiro

2022

Título do trabalho em inglês: Removal evaluation of the estrogenic hormones 17 β - estradiol and 17 α - ethinylestradiol in sewage by a sequencing batch reactor.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

P324a Paula, Lícia Murito de.
Avaliação da remoção dos hormônios estrogênicos 17 β - estradiol e 17 α -etinilestradiol no esgoto por meio de um reator em batelada sequencial / Lícia Murito de Paula. -- 2022.
95 f. : il. color.

Orientador: Jaime Lopes da Mota Oliveira.
Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente), Rio de Janeiro, 2022.
Bibliografia: f. 85-93.

1. Esgotos Domésticos. 2. Tratamento Biológico. 3. Reatores Biológicos Sequenciais. 4. Estradiol. 5. Etinilestradiol. I. Título.

CDD 628.16

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348
Biblioteca de Saúde Pública

Lícia Murito de Paula

Avaliação da Remoção dos Hormônios Estrogênicos 17 β - estradiol e 17 α - etinilestradiol no Esgoto por meio de um Reator em Batelada Sequencial

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 31 de agosto de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Lioi Nascentes
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Eline Simões Gonçalves
Fundação Oswaldo Cruz -Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Rio de Janeiro

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado saúde e fé durante esse momento tão difícil de pandemia que passamos para que pudesse concluir mais essa etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Jaime, por todo ensinamento ao longo de todos esses anos e pelo esforço para que esse trabalho pudesse ser concluído. Obrigada por ser um orientador tão presente e dedicado.

Aos meus pais, Maria e Damião, por todo amor e suporte dado, vocês são minha base e sem a ajuda de vocês eu não conseguiria estar realizando esse sonho.

Ao meu namorado, companheiro de vida, João Paulo, por todo amor e incentivo, obrigada por acreditar em mim e no meu sonho, me apoiar sempre e me mostrar que sou capaz.

À minha irmã, Roberta, pelo incentivo e pelos conselhos dados e a minha tão doce sobrinha, Mariana, por alegrar meus dias e os tornar mais fáceis com sua alegria.

A todos os meus familiares que sempre acreditaram no meu potencial, em especial a minha prima Flávia e a minha tia Madalena.

As minhas queridas amigas que conquistei nessa jornada do doutorado, Talita e Graziella, por compartilharem de perto comigo os momentos de felicidade e tristeza, por terem sempre uma palavra amiga e estarem sempre presentes. Tenho certeza que essa amizade será do doutorado para a vida.

A todos os colegas de turma por toda troca de experiências.

Aos amigos Larissa e Carlos pelos conselhos e conversas de distração, muito obrigada.

Aos funcionários do Laboratório DSSA, muitos que se tornaram até amigos, por abrirem as portas para mim nessa jornada de análises.

Aos membros da minha banca de qualificação e defesa pelas contribuições sugeridas para que pudesse enriquecer este trabalho.

A Fiocruz pela concessão da bolsa durante o período de realização deste doutorado.

A todos não mencionados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para que esta etapa da minha vida fosse concluída.

RESUMO

A contaminação dos recursos hídricos pode causar diversos danos ao meio ambiente, como exemplo, a eutrofização pelo excesso de nutrientes (nitrogênio e fósforo). Outro problema ambiental crescente é a presença de hormônios estrogênicos, tais como o 17 α -etinilestradiol (EE2) e o 17 β -estradiol (E2). Estes micropoluentes vêm causando impactos tanto na saúde animal como humana e uma das principais vias de descarte nos sistemas hídricos é pelo lançamento de efluentes. Com isso, os processos de tratamento de efluentes se tornam uma barreira para o descarte tanto de nutrientes quanto de hormônios no meio ambiente, logo, a busca por processos de tratamentos de esgoto que removam esses contaminantes é de suma importância. Um dos processos que vem se mostrando promissor para remoção desses contaminantes é o reator em batelada sequencial (RBS), pois nele pode-se promover diferentes atividades metabólicas contribuindo para remoção de nutrientes e hormônios. Este trabalho avaliou a remoção de nutrientes e do EE2 e E2 por meio de dois RBS, sendo um reator aclimatado com os hormônios por 102 dias (RBS 1) e outro não (RBS 2). Esses reatores operaram com tempo de retenção hidráulica de 12 horas adotando as etapas anaeróbia, aeróbia e anóxica. A análise dos resíduos de hormônios no esgoto e no lodo foi realizada pelo método de ELISA. Após este período (103 dias), os reatores foram alimentados com esgoto sintético contendo os hormônios (EE2 de 7,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de E2 de 5,96 $\mu\text{g L}^{-1}$). A eficiência na remoção de matéria orgânica foi entre 90 e 96% (em termos de demanda química de oxigênio e carbono orgânico dissolvido), de fósforo foi em média de 79% e de nitrogênio foi acima de 80% nos dois reatores. O EE2 obteve uma remoção média de 35,8% no RBS 1 e 66,5% no RBS 2, e seu provável mecanismo de remoção foi a sorção no lodo, não sendo observada possível biodegradação apesar da alta taxa de remoção de nitrogênio e da aclimação. Este resultado diverge dos achados na literatura, o que indica uma tendência de descarte dos resíduos de EE2 pelo lodo. Em relação ao E2, a remoção média foi de 87,1% no RBS 1 e de 82,8% no RBS 2, sendo observada uma possível biodegradação como mencionado pela literatura.

Palavras-chave: reatores em batelada sequencial; remoção de nutrientes; 17 α -etinilestradiol; 17 β -estradiol; mecanismos de remoção.

ABSTRACT

The contamination of water resources can cause several damages to the environment, such as eutrophication by excess nutrients (nitrogen and phosphorus). Another growing environmental problem is the presence of estrogenic hormones, such as 17 α -ethinylestradiol (EE2) and 17 β -estradiol (E2). These micropollutants have been causing impacts on both animal and human health, and one of the main ways of disposal into water systems is by effluent discharged. As a result, effluent treatment processes become a barrier to the disposal of both nutrients and hormones into the environment, thus the search for sewage treatment processes that remove these contaminants is of great importance. One of the processes that has shown promise for the removal of these contaminants is the Sequencing Batch Reactor (SBR), since it can promote different metabolic activities contributing to the removal of nutrients and hormones. This work evaluated the removal of nutrients and EE2 and E2 through two SBR, one reactor acclimated with hormones for 102 days (SBR 1) and the other not (SBR 2). These reactors operated with a hydraulic retention time of 12 hours, adopting the anaerobic, aerobic and anoxic stages. The analysis of hormone residues in sewage and sludge was performed by the ELISA method. After this period (103 days), the reactors were fed with synthetic sewage containing the hormones (EE2 of 7,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ and E2 of 5,96 $\mu\text{g L}^{-1}$). The removal efficiency for organic matter was between 90 and 96% (in terms of chemical demand for oxygen and dissolved organic carbon), for phosphorus it was on average 79% and for nitrogen it was above 80% in both reactors. EE2 obtained an average removal of 35,8% in SBR 1 and 66,5% in SBR 2, its probable removal mechanism was sorption in the sludge, and possible biodegradation was not observed despite the high rate of nitrogen removal and acclimation. This result differs from the findings in the literature, indicating a tendency for the sludge to dispose of EE2 waste. Regarding E2, the average removal was 87,1% in SBR 1 and 82,8% in SBR 2, being observed a possible biodegradation as mentioned by the literature.

Keywords: sequencing batch reactors; nutrient removal; 17 α -ethinylestradiol; 17 β -estradiol; removal mechanisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos nas células.....	16
Figura 2 - Estrutura química dos hormônios naturais (E1, E2, E3) e sintético (EE2).....	18
Figura 3 - Possíveis rotas de fármacos e estrogênios no meio ambiente.....	20
Figura 4 - Distribuição mundial de estrogênios em águas superficiais.....	22
Figura 5 - Panorama geral da coleta e tratamento de esgotos.....	25
Figura 6 - Percentuais de eficiências de remoção de DBO por região geográfica no Brasil.....	26
Figura 7 - Processos de tratamento de esgoto mais utilizados no Brasil.....	29
Figura 8 - Configuração do RBS.....	37
Figura 9 - Procedimento de preparação das amostras.....	45
Figura 10 - Placa de ELISA após o período de incubação (A), durante a adição da solução de parada (B) e após a adição da solução de parada pronta para leitura (C).....	47
Figura 11 - Valores médios do monitoramento de oxigênio dissolvido (OD) e potencial redox (ORP) realizado pelas sondas nos ciclos dos RBS	54
Figura 12 - Valores de turbidez no efluente tratado nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo de todo o período de funcionamento do processo.....	57
Figura 13 - Concentrações afluentes e efluentes de matéria orgânica (DQO e COD) nos reatores RBS 1 e RBS 2.....	60
Figura 14 - Concentrações de PT afluentes e efluentes nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo de todo o período de funcionamento do processo.....	63
Figura 15 - Concentrações de NT afluentes e efluentes nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo de todo o período de funcionamento do processo.....	65
Figura 16 - Curvas de calibração e na matriz do EE2 e E2 em amostras de esgoto tratado e do lodo.....	69
Figura 17 - Balanço percentual de massa de EE2 na entrada, saídas e permanência nos reatores RBS 1 (a) e RBS 2 (b).....	71
Figura 18 - Liberação acumulada de EE2 pelo esgoto tratado e pelo lodo nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo dos ciclos.....	75
Figura 19 - Balanço percentual de massa de E2 na entrada, saídas e permanência nos	

reatores RBS 1 (a) e RBS 2 (b).....	79
Figura 20 - Liberação acumulada de E2 pelo esgoto tratado e pelo lodo nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo dos ciclos.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades físico-químicas dos hormônios estrogênicos.....	18
Tabela 2 -	Quantidade de estrógenos excretada diariamente pela urina	21
Tabela 3 -	Métodos utilizados para determinação de estrógenos em matrizes aquáticas.....	35
Tabela 4 -	Formulação do esgoto sintético.....	39
Tabela 5 -	Valores de OD e ORP em cada etapa metabólica do processo.....	53
Tabela 6 -	Valores da concentração de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sua relação na biomassa do RBS 1 e RBS 2.....	56
Tabela 7 -	Testes estatísticos de comparação entre RBS 1 e RBS 2 em relação a sua concentração de biomassa (SSV) e turbidez no esgoto tratado.....	57
Tabela 8 -	Eficiência de redução de matéria orgânica (DQO e COD) e remoção de nutrientes (NT e PT) nos reatores RBS 1 e RBS 2.....	61
Tabela 9 -	Dados estatísticos referentes a igualdade significativa em termos de eficiência entre os reatores RBS 1 e RBS 2 em relação a DQO, COD, PT e NT.....	61
Tabela 10 -	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de EE2 e E2 no esgoto tratado.....	67
Tabela 11 -	Valores obtidos para cálculo do percentual de recuperação nas amostras de esgoto tratado.....	70
Tabela 12 -	Valores de concentração, massa e percentual de massa liberados a cada ciclo no esgoto tratado e no lodo de EE2.....	73
Tabela 13 -	Valores de concentração, massa e percentual de massa liberados a cada ciclo no esgoto tratado e no lodo de E2.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	ACETONITRILA
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
DAD	<i>Detector Diode Array</i>
DE	Desreguladores Endócrinos
DES	Desetilbestrol
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INDL	Industrial
LC-FL	Cromatografia Líquida com Detector de Fluorescência
LC-MS	Espectrometria de Massa
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MBR	Membrane Bio Reactor
MEOH	Metanol
NT	Nitrogênio Total
OAF	Organismos Acumuladores de Fósforo
OD	Oxigênio Dissolvido
ORP	Potencial de Oxirredução
PCB	Bifenilaspolicloradas
PCD	Policlorados de Bifenilas

PH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Percentual de Massa
PMSB	Plano Municipal de Saneamento Básico
POA	Processo Oxidativo Avançado
PR	Percentual Relativo
PT	Fósforo Total
R%	Percentual de Recuperação
R ²	Coefficiente de Regressão Linear
RBS	Reator em Batelada Sequencial
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TCO	Taxa de Consumo de Oxigênio
TOC-L	Analisador de Carbono Orgânico Total
TRH	Tempo de Retenção Hidráulica
TRS	Tempo de Retenção dos Sólidos
UASB	Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo
UCT	Sistema de Tratamento de Esgoto Desenvolvido na Universidade de Cape Town
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	16
3.1.1	Hormônios Estrogênicos	17
3.1.2	Ocorrência dos Hormônios Estrogênicos no Meio Ambiente	19
3.1.3	Impactos dos Hormônios Estrogênicos na Saúde Pública e no Meio Ambiente	22
3.2	O ESGOTAMENTO SANITÁRIO NO BRASIL.....	23
3.2.1	Tratamento Biológico do Esgoto	26
3.2.1.1	Lodo Ativado.....	30
3.2.1.2	Reator em Batelada Sequencial (RBS).....	30
3.3	REMOÇÃO DE NUTRIENTES E HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS POR PROCESSOS DE TRATAMENTO DE ESGOTO.....	31
3.3.1	Remoção de Nutrientes	31
3.3.2	Remoção de Hormônios Estrogênicos	32
3.4	METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS NO ESGOTO.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	CONFIGURAÇÃO GERAL DO REATOR.....	37
4.2	PARÂMETROS DE CONTROLE.....	39
4.2.1	Demanda Química de Oxigênio e Carbono Orgânico Dissolvido	39
4.2.2	Nitrogênio Total	40
4.2.3	Fósforo Total	40
4.2.4	Sólidos Suspensos Voláteis	41
4.2.5	Turbidez	41
4.3	DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	41
4.3.1	Taxa de Consumo de Oxigênio específica	42
4.4	DETERMINAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS.....	42

4.4.1	ELISA	42
4.4.1.1	Extração e Purificação das Amostras.....	43
4.4.2	Kit ELISA	46
4.4.2.1	Curva de Calibração e Teste de Recuperação.....	48
4.4.3	HPLC-DAD	49
4.4.3.1	Preparo das Soluções.....	49
4.4.3.2	Extração e Purificação das Amostras.....	49
4.4.3.3	Condições Cromatográficas.....	49
4.4.3.4	Curva de Calibração, Limites de Detecção e Quantificação e Teste de Recuperação.....	49
4.5	CÁLCULO DO BALANÇO DE MASSAS DOS HORMÔNIOS.....	50
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	DESEMPENHO DOS REATORES.....	53
5.1.1	Oxigênio Dissolvido (OD) e Potencial de Oxirredução (ORP)	53
5.1.2	Concentração de Biomassa	55
5.1.3	Taxa de Consumo de Oxigênio (TCO) e Taxa de Consumo de Oxigênio Específica (TCOspec.)	58
5.1.4	Redução de Matéria Orgânica	58
5.1.5	Remoção de Nutrientes	62
5.1.5.1	Fósforo.....	62
5.1.5.2	Nitrogênio.....	64
5.2	AVALIAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS NOS RBS.....	66
5.2.1	Quantificação dos Hormônios no Esgoto Tratado e no Lodo Descartado	66
5.2.2	Remoção do EE2 e E2	70
5.2.2.1	EE2.....	70
5.2.2.2	E2.....	78
6	CONCLUSÃO	83
7	CONSIDERAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
	REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

Atualmente uma classe de substâncias tem ganhado espaço no campo das pesquisas, os micropoluentes emergentes. Eles são considerados emergentes pois não existem normas ou exigências em leis sobre a segurança desses compostos e nem os limites máximos permitidos para lançamento no meio. Além disso, esses compostos são normalmente encontrados em concentrações muito baixas ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) e, mesmo nesses níveis são capazes de provocar efeitos danosos à vida selvagem e ao homem (AQUINO et al., 2013; BILA & DEZOTTI, 2007). Tais efeitos citados na literatura são alterações no desenvolvimento, crescimento, reprodução e comportamento. Por isso, muitas dessas substâncias são denominadas de desreguladores endócrinos (DE) (KHASAWNEH et al., 2021).

Diversas substâncias tanto sintéticas como naturais possuem potencial para causar desregulação endócrina, tais como alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCB), bisfenol A, além de diversos outros compostos farmacêuticos (BILA & DEZOTTI, 2007). Os hormônios estrogênicos, que podem ser naturais (estriol, estrona e 17β -estradiol) ou sintéticos (17α -etinilestradiol), são exemplos de DE que vêm sendo bastante estudados devido a sua ocorrência em matrizes aquáticas e pelos seus potenciais efeitos nos sistemas orgânicos (KHASAWNEH et al., 2021).

A ocorrência desses hormônios no ambiente aquático pode se dar através do descarte do efluente doméstico e hospitalar e/ou pelos processos de produção animal, bem como pelo descarte incorreto de resíduos de medicamentos. A sua quantidade descartada está relacionada ao seu uso e/ou consumo (LUO et al., 2014). Outro fator que afeta tanto a quantidade de estrogênios no ambiente quanto a sua forma química é a sua metabolização humana e animal antes do seu descarte (excreção) junto aos efluentes (OLIVEIRA, 2015).

Uma maneira de se evitar ou minimizar a quantidade desses micropoluentes no meio ambiente aquático seria através da implantação de processos de tratamento de esgoto capazes de removê-los. O problema é que as estações convencionais de tratamento de esgoto (ETEs) não foram (ou são) projetadas para remover esses tipos de contaminantes, mas visam atender aos requisitos básicos exigidos pela legislação ambiental (CONAMA de 2011). Por outro lado, no campo da pesquisa, diferentes processos biológicos, físicos e/ou químicos de tratamento de esgotos são testados para encontrar aquele que melhor promova a remoção e/ou degradação desses compostos (IVANOV et al., 2009; GABET-GIRAUD et al., 2010; PESSOA et al., 2014; PAULA, 2017).

O reator em batelada sequencial (RBS) é uma das alternativas possivelmente viáveis para realizar a remoção/degradação dessas substâncias (FANG et al., 2019; CASTELLANOS et al., 2021a). O RBS é uma variante compacta do sistema por lodo ativado que pode promover diferentes etapas metabólicas (anaeróbia, aeróbia e anóxica) capazes de remover nutrientes (nitrogênio e fósforo) (MOTA & VON SPERLING, 2009), o que sugere seu potencial de remoção de hormônios estrogênicos.

A remoção de nutrientes é um ponto importante a ser estudado, visto que o excesso de nitrogênio e fósforo presentes no meio aquático podem causar a eutrofização, podendo ocorrer a proliferação de algas e cianobactérias. O excesso de algas pode gerar a liberação de toxinas prejudiciais à saúde do homem e animal, provocando a morte de organismos marinhos. O nitrogênio na forma de nitrato, em especial, pode provocar a síndrome do bebê azul, também conhecida como síndrome da metahemoglobinemia (JORDÃO & PESSÔA, 2011; MOTA & VON SPERLING, 2009).

Estudos anteriores já observaram a co-remoção de nutrientes e hormônios estrogênicos (PAULA, 2017; PETRIE et al., 2014; SUAREZ et al., 2010; ESPERANZA et al., 2006; SERVOS et al., 2004). Porém, algumas lacunas deste processo ainda precisam ser melhores abordadas, como por exemplo identificar os principais mecanismos de remoção desses DE nos processos de tratamento de esgoto, tendo como principais vias de remoção através da sorção no lodo ou da biodegradação.

Diante disso, este trabalho avaliou a remoção simultânea de nitrogênio, fósforo e dos hormônios estrogênicos 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) por meio de dois RBS buscando identificar a via de remoção desses contaminantes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a remoção dos hormônios estrogênicos 17β - estradiol (E2) e 17α - etinilestradiol (EE2) por meio de dois reatores em batelada sequencial (RBS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

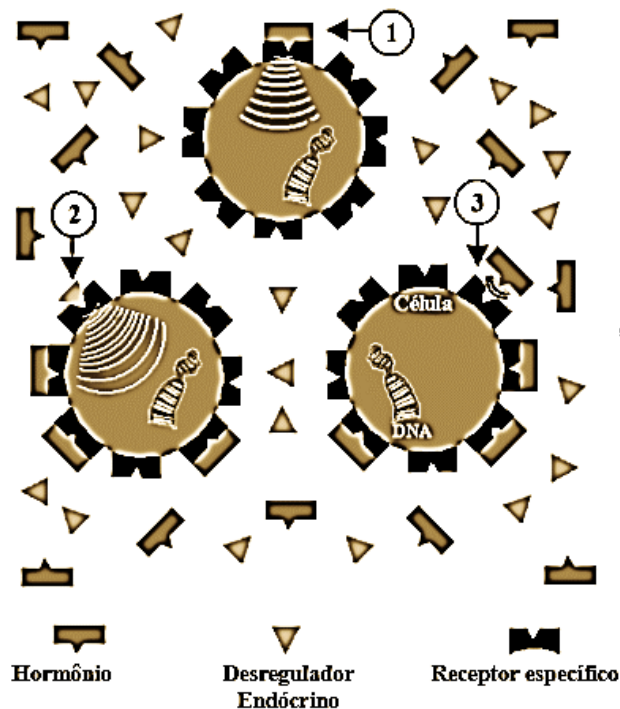
1. Analisar a eficiência do RBS em relação à remoção de nutrientes (NT e PT) e matéria orgânica;
2. Testar a aplicação do teste de Elisa na análise dos hormônios estrogênicos E2 e EE2 em esgoto e lodo biológico;
3. Avaliar a remoção de E2 e EE2 por um RBS aclimatado a estes micropoluentes e outro sem a aclimação;
4. Identificar os possíveis mecanismos de remoção a partir do balanço de massas dos hormônios nas matrizes (esgoto tratado e lodo biológico).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os desreguladores endócrinos (DE) são substâncias exógenas que interferem no funcionamento do sistema endócrino, podendo imitar a ação de um hormônio endógeno e afetar as funções controladas por um dado hormônio. Com sua presença, as concentrações dos hormônios naturais no corpo tendem a alterar, pois os DE prejudicam a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção desses hormônios, além de bloquear os receptores hormonais nas células, impedindo seu funcionamento natural (USEPA, 1997; BILA, 2005). Em suma, várias ações metabólicas dos organismos podem ser alteradas. A Figura 1 ilustra alguns desses mecanismos de ação de um DE. Neste mecanismo um DE pode se ligar aos receptores de uma célula. Esta ligação pode promover com maior ou menor intensidade a transmissão de sinais para essas células e, esses sinais podem promover funções diferentes das normais. Por outro lado, esta ligação do DE a esses receptores bloqueia a ligação do hormônio normal. Com isso, um DE pode potenciar, reduzir ou negativar um determinado mecanismo metabólico (BILA, 2005).

Figura 1. Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos nas células.



Nota: (1) célula recebendo seu sinal normal; (2) DE se ligando a célula e emitindo sinais diferentes dos normais; (3) DE bloqueando o a ligação normal.

Fonte: Adaptado de BILA, 2005.

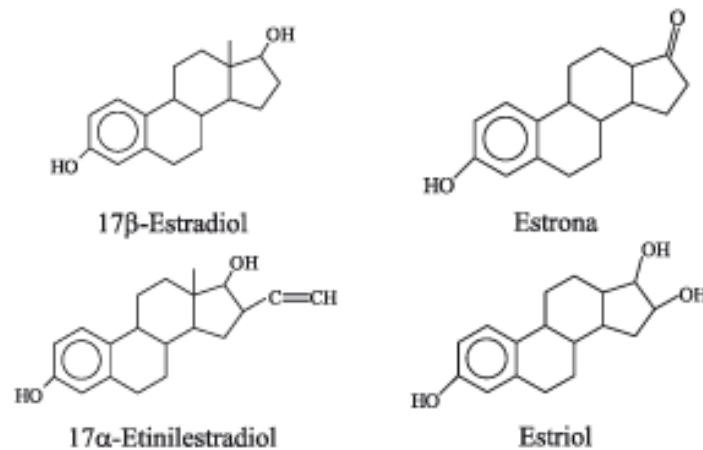
Os DE podem ser encontrados em concentrações muito baixas ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) no meio ambiente, porém seus efeitos não dependem apenas da concentração encontrada. Características da própria substância como lipofilicidade, persistência e bioacumulação do organismo como tempo de exposição, biotransformação e excreção podem alterar os efeitos de um DE (BILA, 2005).

Um vasto número de substâncias pode ser considerado DE, sejam elas naturais ou sintéticas. Dentre os DEs naturais se destacam os fitoestrogênios (genisteína e metaresinol) e os hormônios naturais (17β - estradiol, estrona, estriol e testosterona). Dentre os compostos sintéticos temos os produzidos/gerados pelas indústrias químicas e petroquímicas como dioxinas, bifenilaspolicloradas (PCB), alquilfenóis e seus subprodutos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), ftalatos, bisfenol A e metais tóxicos, os de uso na agricultura, tais como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas. Além desses, diferentes compostos farmacêuticos sintéticos como desetilbestrol (DES) e o 17α -etinilestradiol possuem a capacidade desreguladora (BILA & DEZZOTI, 2007; SURANA et al., 2022).

3.1.1 Hormônios Estrogênicos

Os estrogênios são esteroides hormonais podendo ser naturais como o 17β -estradiol, estrona e estriol ou sintéticos como o 17α -etinilestradiol. Eles são importantes para a biologia e fisiologia humana, pois ajudam a regular no ciclo reprodutivo (menstrual) incluindo gravidez, atuam no sistema cardiovascular, na força óssea, no comportamento cognitivo e no sistema gastrointestinal (ADEEL et al., 2017). Tais mecanismos ocorrem em concentrações sorológicas na faixa de nmol. L^{-1} ou pmol. L^{-1} , logo pequenas quantidades são suficientes para promover a regulação deste sistema (ADEEL et al., 2017).

A estrutura química dos estrogênios compartilha o mesmo quadro molecular tetracíclico que compreende quatro anéis como mostra a Figura 2. As diferenças estruturais estão na configuração do anel D nas posições do carbono 16 (C16) e 17 (C17). O estrogênio 17β -estradiol (E2) tem uma hidroxila e um hidrogênio no C17 e hidrogênios no C16. A estrona (E1) se diferencia de E2, pois tem uma carbonila em C17, enquanto que o estriol (E3) tem duas hidroxilas nesses dois carbonos (C16 e C17). A diferença entre E2 e o 17α -etinilestradiol (EE2) está somente no C16 onde o EE2 tem um radical etinil substituindo os hidrogênios de E2 (ADEEL et al., 2017).

Figura 2. Estrutura química dos hormônios naturais (E1, E2 e E3) e sintético (EE2).

Fonte: Adaptado de Cunha (2017).

Conhecer as propriedades físico-químicas dos estrogênios é importante para poder entender seu comportamento no ambiente e/ou no processo de tratamento de esgoto. A Tabela 1 mostra algumas das características físico-químicas dos hormônios estrogênicos. Dependendo de sua característica, esses hormônios podem sofrer diferentes mecanismos de remoção, tais como sorção pela biomassa (lodo) e/ou biodegradação (SHI et al., 2013). A preferência de um composto pelo meio aquoso ou não pode ser observado pelo seu coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}). Valores de K_{ow} maiores que 5,0 mostram que o composto possui maior afinidade a solventes orgânicos do que com a água, logo tendem a se sorver a matéria orgânica do meio. Outra propriedade muito importante é o coeficiente de distribuição (K_d) pois ajuda a estimar o potencial de sorção dos compostos ao sistema solo ou sedimento. Quanto maior for o K_d maior será a chance de a substância ficar adsorvida ao solo e/ou sedimento (SANTOS, 2011; CUNHA et al. 2016; FILHO et al. 2006;). Desse modo, os estrógenos E2 e EE2 tem maior afinidade à matéria orgânica do que o E1 e E3, mas todos possuem o mesmo potencial de sorção ao sedimento (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos hormônios estrogênicos.

Estrogênio	CAS	Log K_{ow}	p K_a	Log K_d	Meia vida* (dias)
E1	53-16-7	3,13	10,4	2,44 – 2,72	2 – 3
E2	50-28-2	4,01	10,4	2,45 – 2,83	2 – 3
E3	50-27-1	2,45	10,3	-	-
EE2	57-63-6	3,67	10,46 – 10,7	2,65 – 2,86	4 – 6

Onde: CAS – Chemical Abstract Service ; K_{ow} – Coeficiente de partição octanol/água; p K_a – Constante de dissociação ácida; K_d – Coeficiente de distribuição; *valores referentes a meia vida no meio ambiente.

Fonte: Adaptado de CUNHA (2017); FILHO et al. (2006); SANTOS (2011).

Outra característica importante para conhecer o potencial de degradação de determinada substância é a sua meia vida. O tempo de meia vida é calculado a partir dos valores de concentração inicial colocado em um determinado meio ou administrado, sendo acompanhado até que ela seja reduzida à metade (50%). No caso do corpo humano feminino, o tempo de meia vida depende da depuração metabólica do hormônio uma vez que ele pode ser eliminado pela urina ou pelas fezes via inativação pelo fígado ou pela secreção da bile (WIDMAIER et al., 2013). Além disso, parte dos estrogênios que são excretados em sua forma inativa podem se tornar bioativos no ambiente, pois bactérias do trato digestivo (coliformes) comuns em animais de sangue quente (mamíferos e aves) são capazes de transformar esses compostos retornando-os em sua forma ativa (FILHO et al., 2006).

A Tabela 1 mostra que os hormônios estrogênicos possuem uma meia vida curta, o que não corrobora com sua ocorrência no meio ambiente. A persistência desses compostos pode ser observada devido a sua contínua introdução no ambiente, uma vez que, não há uma correlação entre a sua solubilidade em água e sua biodisponibilidade, bem como na sua proporção excretada e a sua concentração no ambiente aquático (SANTOS, 2011). Visto a complexidade desse composto no meio, são importantes estudos que abordem seus principais mecanismos em diferentes matrizes ambientais.

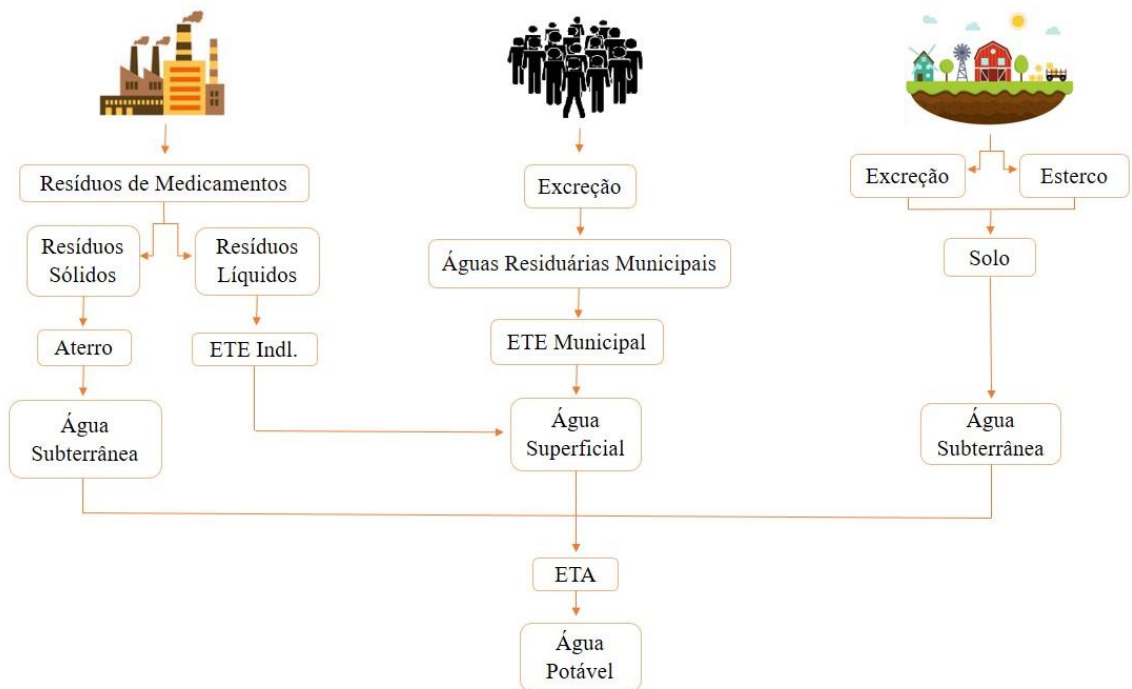
Os estudos sobre o comportamento desses compostos em diferentes sistemas como nos processos de tratamento de esgotos têm como desafio a identificação do seu potencial de remoção/degradação. A degradação dos estrogênios pode ocorrer por fatores abióticos como temperatura e luz solar e, ainda por fenômenos químicos como hidrólise e oxidação (NGUYEN et al., 2021). No entanto, fatores bióticos também podem promover a degradação e/ou remoção desses compostos. Em ambientes anaeróbios é comum observar reações de redução, enquanto que em sistemas aeróbios a oxidação promove a degradação de uma gama de compostos orgânicos (CASTELLANOS et al., 2021a), logo é provável que reações bioquímicas também sejam favoráveis a biodegração de estrogênios. Por outro lado, é comum serem observados mecanismos de biosorção em sistemas biológicos (SHI et al., 2013). Uma lacuna nesse tipo de estudo é conseguir identificar os resíduos de metabólitos gerados (OSACHOFF et al., 2014; PAULA, 2017).

3.1.2 Ocorrência dos Hormônios Estrogênicos no Meio Ambiente

As fontes de contaminação de estrogênios no meio ambiente relatadas por alguns autores são pela excreção natural (urina e fezes), descarte incorreto de medicamentos, estrume

animal, aplicação de hormônio em animais e uso do lodo das ETES como bioossólidos na agricultura urbana (BILA; DEZOTTI, 2007; OLIVEIRA et al., 2015; ADEEL et al., 2017) como mostra a Figura 3. Logo, as principais vias de exposição humana aos resíduos desses compostos são através da ingestão de água e alimentos (BILA; DEZOTTI, 2007).

Figura 3. Possíveis rotas de fármacos e estrogênios no meio ambiente.



Notas: ETE = estação de tratamento de esgoto; Indl. = industrial; ETA = estação de tratamento de água.
Fonte: A autora.

A quantidade de hormônios estrogênicos excretada por diferentes organismos é influenciada por uma série de fatores, dentre eles o estado de saúde e gravidez, alimentação, idade, entre outros (LINTELMANN et al., 2003). A Tabela 2 mostra os valores médios de excreção dos hormônios naturais pelos seres humanos. A quantidade do hormônio sintético (EE2) a ser excretada pela urina pode variar de 22 a 50% da dose diária ingerida (De MES et al., 2005).

Tabela 2. Quantidade de estrógenos excretada diariamente pela urina.

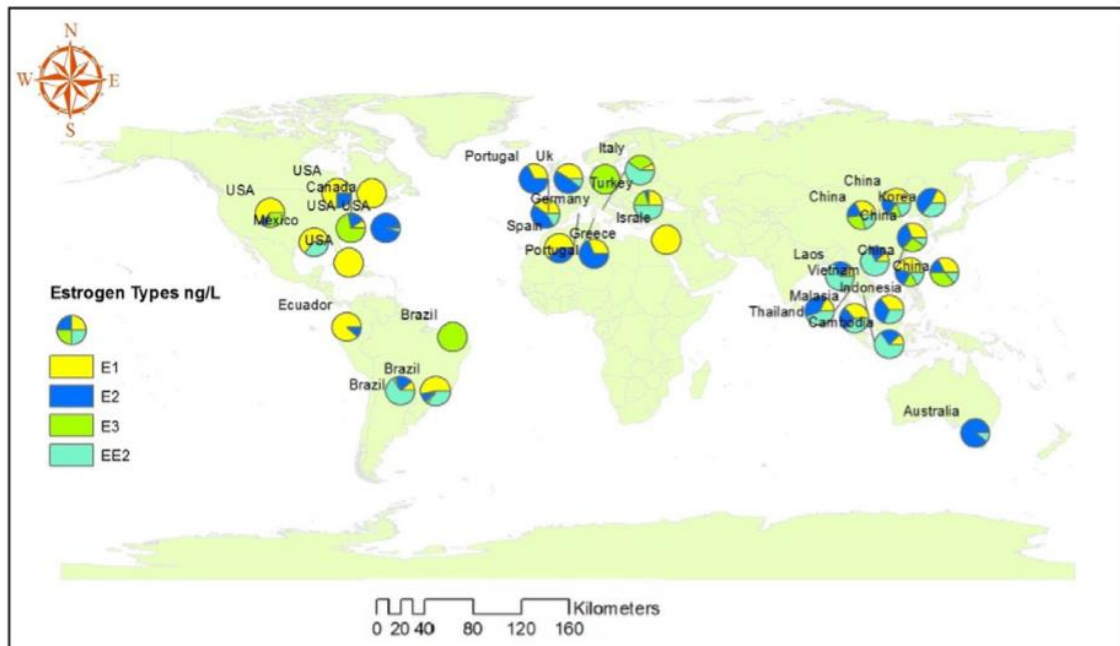
Estrógeno	Excreção Homem (µg/24h)	Excreção Mulher Menstruação (µg/24h)	Excreção Mulher Gravidez (µg/24h)	Excreção Mulher Menopausa (µg/24h)
Estriol (E1)	1,5	4,8	6000	1,0
17 β-Estradiol (E2)	1,6	3,5	259	2,3
Estrona (E3)	3,9	8,0	600	4,0

Fonte: Adaptado de FILHO et al. (2006).

Uma vez que a excreção contínua é uma fonte potencial de persistência ambiental de resíduos de estrogênios no meio ambiente, diversos estudos no Brasil e outros países vêm encontrando hormônios em matrizes aquáticas, águas superficiais e esgoto (SERVOS et al., 2004; LISHMAN et al., 2006; CHIMCHIRIAN et al., 2007; ZHANG et al., 2011; ATKINKSON et al., 2012; QUEIROZ et al., 2012; PESSOA et al., 2014). Segundo levantamento realizado por Cunha et al. (2017), as concentrações relatadas de estrogênios encontradas nas matrizes aquáticas no Brasil são superiores aos dos outros países. No Brasil, os valores ficam na ordem de 4.000 ng L⁻¹ enquanto nos outros países a concentração não chega a atingir 1.000 ng L⁻¹. Isso pode se dar ao fato de o Brasil possuir um saneamento básico ineficaz, que não atende nem metade da sua população (BRASIL, 2017). Destaca-se ainda que estudos sobre ocorrência de hormônios em água e esgoto no Brasil são escassos (Cunha et al., 2017).

Adeel et al. (2017) em seu estudo elaborou um mapa que ilustra como estão distribuídos pelo mundo esses estrogênios nas águas superficiais, como mostra a Figura 4. Neste mapa pode-se observar que no Brasil há uma grande ocorrência do hormônio sintético, do estriol e estrona, enquanto nos outros países da América não se nota muito o aparecimento do EE2 e nos países europeus há a prevalência dos hormônios naturais. No continente asiático observa-se mais a ocorrência do EE2, E1 e E2.

Figura 4. Distribuição mundial de estrogênios em águas superficiais.



Fonte: Adeel et al. (2017).

3.1.3 Impactos dos Hormônios Estrogênicos na Saúde Pública e no Meio Ambiente

Um dos principais motivos que desencadearam os estudos sobre os hormônios no meio ambiente é o impacto que eles podem causar na biota aquática e no homem. A desregulação endócrina é um dos principais distúrbios observados associados aos hormônios (BILA & DEZOTTI, 2007).

A partir dos valores encontrados de hormônios nas matrizes aquáticas, pode-se realizar um cálculo de quociente de risco para avaliação da exposição a esses contaminantes. Esse cálculo é feito através da razão entre a concentração ambiental medida (Predictive Environmental Concentration – PEC) e a concentração prevista do contaminante que não causa efeito (Predictive No Effect Concentration – PNEC). Se esta razão for maior que 1, há um risco deste hormônio à saúde humana e/ou à biota. Os valores dos hormônios E1, E2 e EE2 nos efluentes das estações de tratamento de esgoto são normalmente maiores que 1, ou seja, estão apresentando alto risco ecológico, enquanto que o E3 apresenta menor risco dentre os outros hormônios (SUN et al., 2013).

A desregulação pode se dar de várias formas. O poluente pode mimetizar um hormônio natural fazendo com que o corpo tenha uma resposta excessiva a esse estímulo ou respondendo em momentos inadequados. Eles podem bloquear os efeitos do hormônio ao se ligar aos seus receptores e, podem ainda, causar super ou subprodução de hormônios (USEPA, 2017). Os

estrógenos podem interferir nas funções fisiológicas e bioquímicas, podendo desenvolver patologias como disfunções reprodutivas, cânceres de mama, de testículo e de próstata (KOIFMAN; PAUMGARTTEN, 2002).

Os peixes são os indivíduos mais estudados para observar os efeitos da desregulação endócrina. Neles foi relatada a síntese excessiva de vitelogenina que pode gerar a feminização dos machos diminuindo a reprodução da espécie. Além disso, eles podem provocar alteração nas gônadas e inibição do crescimento testicular (PANTER et al., 1998; ALLEN et al., 1999; PANTER et al., 2000; ROBINSON et al., 2003; ANKLEY et al., 2017). Logo, essas constatações geram preocupações no que diz respeito a uma desestabilidade no ecossistema nos casos de contaminação hídrica por estrogênios. Outros organismos como anuros também já foram usados em estudos de desregulação por hormônios. Salla et al. (2016) relataram alteração na função cardíaca dos girinos provocado pelo EE2. Eles passaram a apresentar taquicardia e um aumento na demanda cardíaca quando expostos ao EE2. Este problema pode deixar esses animais mais susceptíveis a predadores. Em humanos, estudos apontaram que estes estrogênios podem provocar a indução de cânceres de mama e de próstata (NELLES et al., 2012; MOORE et al., 2016) e da menopausa nas mulheres (ADEEL et al., 2017).

As evidências expostas deixam clara a necessidade de serem implantadas medidas imediatas que atuem como barreiras desses contaminantes no meio ambiente. Sendo sua principal forma de introdução através do esgoto, seria importante aumentar os investimentos para que os esgotos sejam devidamente coletados e tratados, implantar mais ETEs e aperfeiçoar as estações de tratamento para a remoção desses compostos.

3.2 O ESGOTAMENTO SANITÁRIO NO BRASIL

A correlação entre os serviços de esgotamento sanitário e a qualidade de vida das pessoas já é amplamente reconhecida como mostra o Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (2009). A falta destes serviços pode propiciar a ocorrência de doenças de veiculação hídrica que, dentre alguma delas estão hepatites virais, leptospirose, doenças diarreicas, febre tifoide e esquistossomose, sendo considerado então um problema de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

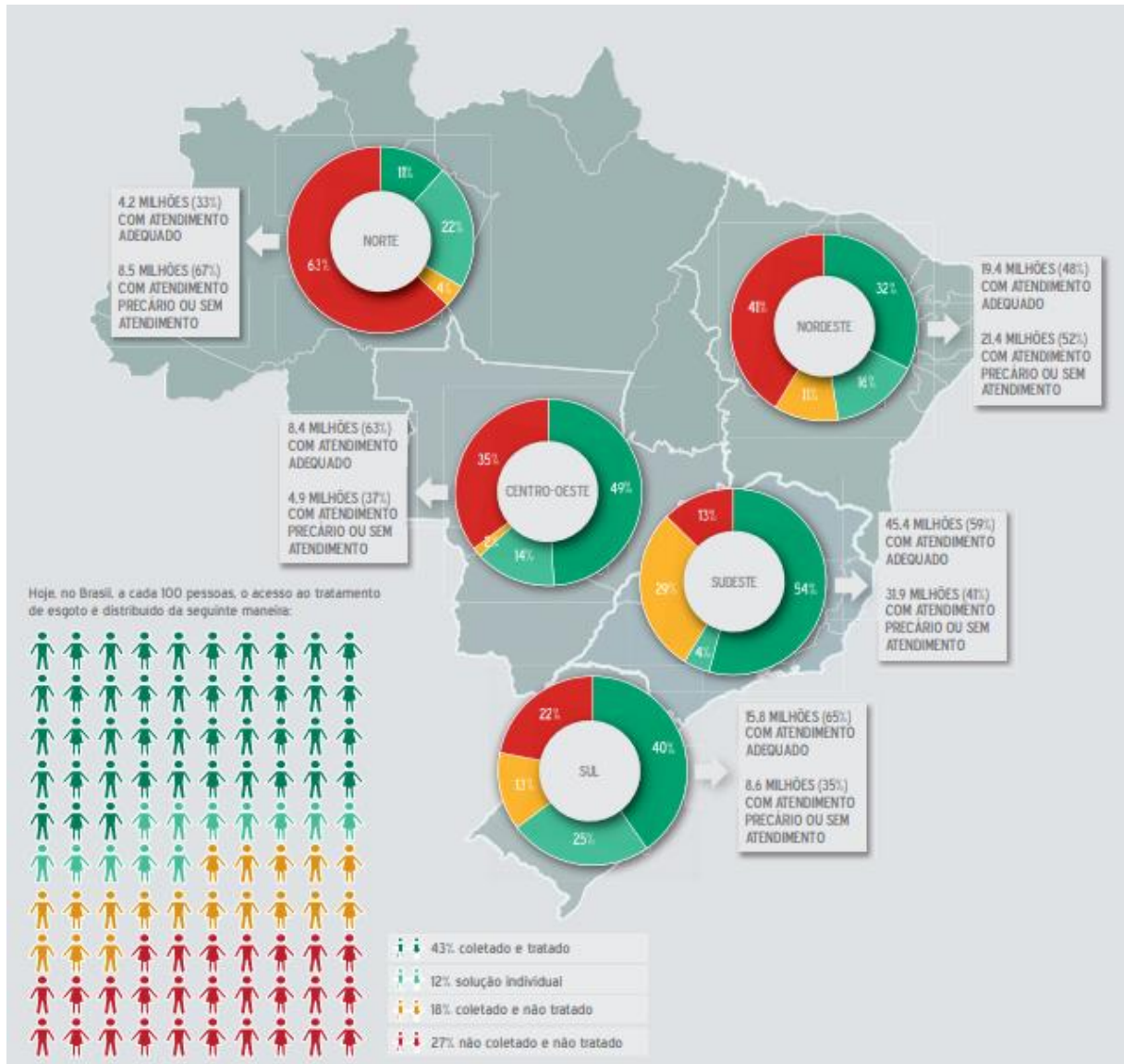
Para reduzir esses problemas foi publicada a Lei 11.445/2007, que dispõe sobre as diretrizes nacionais para o saneamento básico e para a política federal de saneamento básico. Nesta lei o esgotamento sanitário foi definido como o conjunto das unidades que, abarcam

desde a coleta até a sua disposição final adequada, passando pelas unidades de tratamento (BRASIL, 2007).

No entanto, até hoje, o Brasil possui índices insatisfatórios de acesso aos serviços de esgotamento sanitário, reflexo do descaso com o saneamento básico e ao crescimento populacional desordenado. Segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2018), o Brasil possui 325,6 mil quilômetros de redes de coleta de esgoto, às quais se conectam 32,5 milhões de ligações de esgotos. O atendimento da população total com coleta de esgotos é de 53,2%. O índice médio do país para tratamento de esgoto chega a 46,3% dos esgotos gerados, já o índice médio de tratamento de esgotos coletados que representa a parcela do volume de esgotos tratado em relação ao volume coletado é igual a 74,5%. Tendo uma visão mais global, o volume médio anual de esgoto gerado pela população brasileira é de 11 bilhões m³ e somente um pouco mais de 4,3 bilhões de m³ são coletados e tratados (SNIS, 2018).

Esse cenário fica mais claro observando o panorama geral de coleta e tratamento de esgotos do Atlas de Esgoto da Agência Nacional de Águas (2017) mostrado na Figura 5. Nele pode ser observada a distribuição de esgoto não coletado, coletado e não tratado, coletado e tratado e ainda soluções individuais por região brasileira. A Região Norte é a que possui menor atendimento com coleta e tratamento (63%) e, em contrapartida, a Sudeste apresenta maior percentual de tratamento (59%). Este índice ainda está abaixo para os padrões desejáveis quando se pensa em universalização dos serviços de saneamento. Esses dados podem ser ainda menores se forem considerados dados locais e mais precisos onde mostram que apesar das redes já construídas, muitas residências ainda não estão devidamente ligadas a essa rede (SNIS, 2018).

Figura 5. Panorama geral da coleta e tratamento de esgotos.



Fonte: BRASIL (2017).

Uma medida adotada pelo governo para tentar aumentar esses preocupantes percentuais foi a publicação do Decreto nº 8.211 de 2014 que determina que apenas os municípios que dispõem de um Plano Municipal de Saneamento Básico (PMSB) poderão passar a ter acesso aos recursos da União destinados a serviços de saneamento básico (BRASIL, 2014). Mesmo com essas medidas, sabe-se que muito ainda se precisa fazer para reverter o atual cenário, pois existem muitos municípios pequenos que não possuem nenhuma estrutura de esgotamento sanitário e outros que, mesmo com o processo implantado, o tratamento ainda não é eficaz, como pode-se observar na Figura 6 no que se diz respeito em relação a remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e, em especial, a remoção de nutrientes.

Figura 6. Percentuais de eficiências de remoção de DBO por região geográfica no Brasil.



Fonte: Adaptado de BRASIL (2017).

Podemos observar que, além do baixo número de ETEs por municípios, se nos basearmos nos sistemas com eficiência de remoção de matéria orgânica acima de 80%, não chegamos a 50% de atendimento. Analisando os níveis de remoção de nutrientes, o maior percentual alcançado foi de 8% na região Sudeste. Nota-se a necessidade de se construir mais ETEs e aperfeiçoar as já existentes para que esses processos aumente a eficiência de remoção de nutrientes.

3.2.1 Tratamento Biológico do Esgoto

O processo biológico se caracteriza pelo tratamento do esgoto através da atividade microbiana, ou seja, pelos fenômenos biológicos que acontecem na natureza. Esses processos consistem em protótipos artificiais, compactos e concentrados de processos naturais de depuração. Neles agem uma diversificada população microbiana que tem o papel fundamental no tratamento e que em função da sua funcionalidade no processo se desenvolve e cresce nesses sistemas. Esse crescimento é influenciado por fatores ambientais, pelo dimensionamento do processo, pelas características do esgoto e pela operação dos sistemas. A princípio, esse processo remove substâncias orgânicas biodegradáveis, coloidais ou dissolvidas, e alguns podem promover a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) (DEZZOTI, 2008; METCALF & EDDY, 2016;).

Segundo METCALF & EDDY (2016), os objetivos gerais desse tipo de tratamento são:

- Transformar constituintes biodegradáveis dissolvidos e particulados em produtos finais aceitáveis;
- Incorporar em um floco biológico ou biofilme os sólidos suspensos e os coloidais não sedimentáveis;
- Remoção de nutrientes, nitrogênio e fósforo, ou sua transformação;
- A depender do caso, pode ocorrer a remoção de constituintes e específicos compostos orgânicos em nível traço.

Existem diferentes processos de tratamento de esgoto que podem ser aeróbios ou anaeróbios, com biomassa suspensa (lodo) ou aderida (biofilme). Dentre os mais comuns destacam-se (DEZOTTI, 2008):

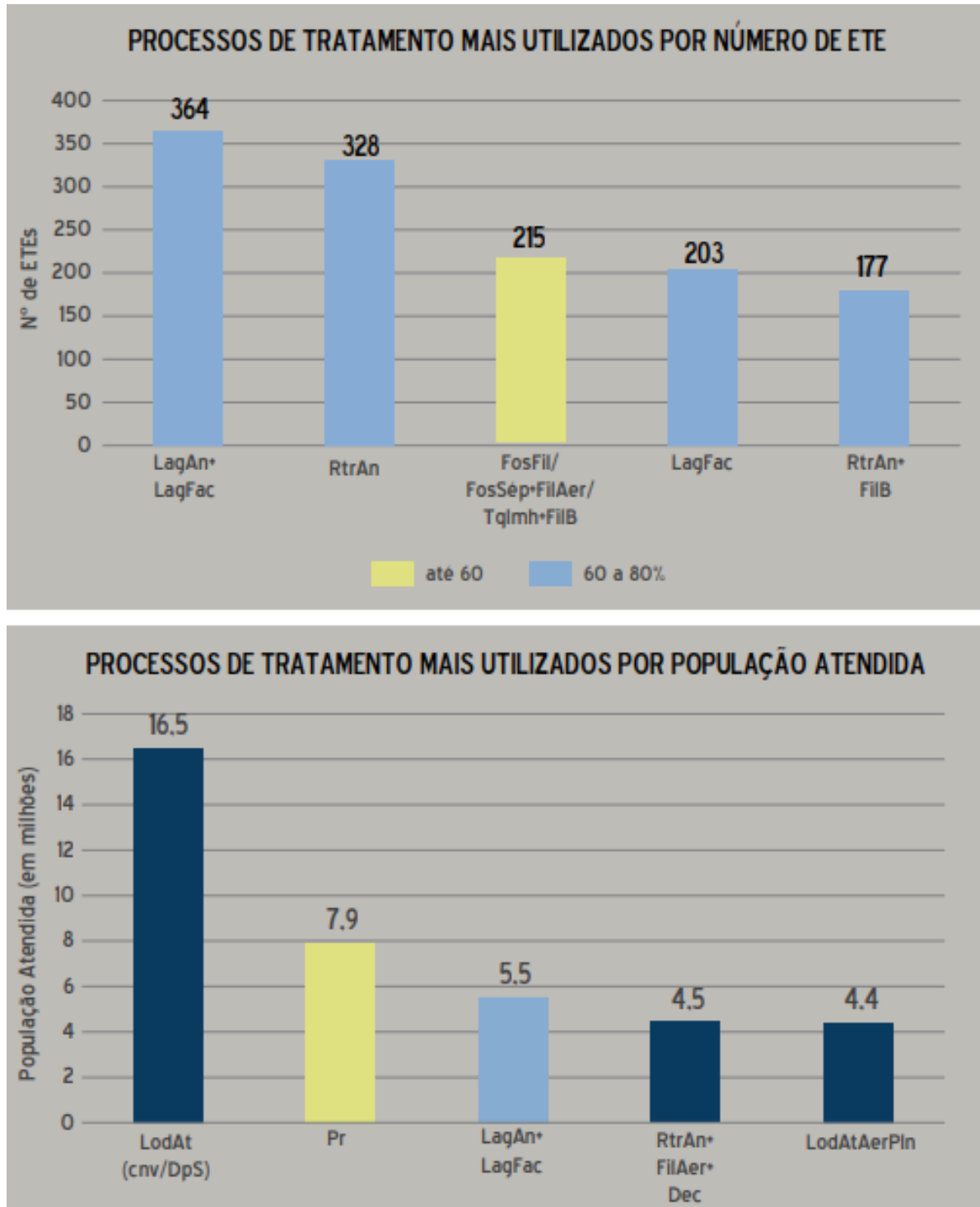
- Lagoas de estabilização: lagoas facultativas, lagoas aeradas facultativas, lagoas anaeróbias, lagoas aeradas com mistura completa, lagoas de alta taxa, lagoas de maturação;
- Sistemas de lodos ativados e variantes: lodo ativado convencional ou por aeração prolongada, lodos ativados com fluxo contínuo ou intermitentes, valos de oxidação.
- Sistemas anaeróbios: tanques sépticos, tanques Imhoff, filtros anaeróbios, reatores UASB, reatores anaeróbios de leito expandido ou fluidificado.
- Sistemas aeróbios com leito fixo ou móvel: filtros biológicos, biodiscos, biofiltros aerados, MBBR, MBR.

Vale ressaltar que, mesmo os processos sendo separados em aeróbios e anaeróbios, podem ocorrer situações em que se proponham sistemas mistos, ou seja, sistemas capazes de promover etapas metabólicas distintas (anaeróbias, aeróbias e anóxicas) como nos sistemas multiestágios (Bardenpho e UCT) e nos reatores em bateladas sequenciais (RBS) (VON SPERLING, 2012). É possível que em outros sistemas possa ocorrer micro-habitats com diferentes atividades metabólicas como no interior do biofilme nos processos com biomassa aderida ou no grânulo do sistema por lodo granular aeróbio ou ainda no fundo de lagoas facultativas. No entanto, nesses processos é difícil se observar com precisão a ocorrência dessas fases metabólicas, sendo necessário o uso de microsensores ou por medidas indiretas (eficiência de desnitrificação em sistemas anóxicos/aeróbios), já nos sistemas multiestágios e no RBS

sensores de oxigênio dissolvido (OD) e de potencial redox (ORP) podem informar a prevalência de determinado estágio (VON SPERLING, 2012).

Podemos observar que, no Brasil, os sistemas biológicos são os processos mais utilizados para o tratamento de esgotos (Figura 7). A lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa é o processo com maior quantidade de unidades instaladas no país, enquanto que o processo que atende maior quantidade de pessoas é o lodo ativado. Esses processos são bastante utilizados em grandes cidades devido a serem mais compactos e por produzirem efluente que atendam a legislação, além de conseguirem obter uma boa remoção de sólidos suspensos totais (SST) e demanda biológica de oxigênio (DBO) (JORDÃO; PESSÔA, 2011).

Figura 7. Processos de tratamento de esgoto mais utilizados no Brasil.



Onde: LagAn- Lagoa Anaeróbia; LagFac- Lagoa facultativa; FosFil/FosSép+FilAer/Tqlmh+FilB- fossa filtro/fossa séptica + filtro aeróbio/tanque imhoff + filtro biológico; RtrAn+FilB- reator anaeróbio + filtro biológico; LodAt- lodo ativado; Pr- primário; Dec- decantador; LodAtAerPln- lodo ativado de aeração prolongada.

Fonte: BRASIL (2017).

3.2.1.1 Lodo Ativado

O lodo ativado é um tipo de tratamento biológico de esgoto composto praticamente por tanque de aeração, decantador e linha de recirculação do lodo. No tanque ocorre a remoção de matéria orgânica através de reações bioquímicas. O desenvolvimento da biomassa ocorre através da utilização do substrato encontrado no esgoto bruto. A sedimentação dessa biomassa ocorre no decantador possibilitando a separação do lodo e do efluente final. O efluente final é descartado e o lodo que ficou sedimentado no fundo do decantador é recirculado para o tanque de aeração proporcionando um aumento da biomassa (VON SPERLING, 2012).

Nos processos de tratamento de esgotos existem duas variáveis operacionais importantes: o tempo de retenção hidráulica (TRH) e o tempo de retenção dos sólidos (TRS) (VON SPERLING, 2012). O TRH corresponde ao tempo de contato entre o esgoto e a biomassa (lodo) e ele deve ser suficiente para que ocorra a metabolização de toda matéria orgânica do esgoto. Um maior TRH possibilita um maior tempo para a degradação da matéria orgânica do esgoto, havendo um limite. Se este tempo for muito estendido pode provocar a morte dos micro-organismos presentes no lodo por carência nutricional, promovendo a liberação de matéria orgânica para o esgoto. Como no processo por lodo ativado ocorre recirculação de lodo do decantador para o tanque de aeração, é previsto o crescimento de biomassa ao longo do tempo e o tempo de manutenção dessa biomassa no sistema corresponde ao TRS ou idade do lodo. Maiores valores de TRS podem favorecer o estabelecimento de micro-organismos que possuem baixa taxa de crescimento específico como observado nos sistemas nitrificantes. O que se busca é um equilíbrio entre a produção de biomassa no sistema e a sua retirada renovando os micro-organismos do sistema (VON SPERLING, 2012).

Segundo von Sperling (2012), as variantes do processo de lodos ativados ocorrem devido ao TRH e ao TRS podendo ser de alta taxa, convencional ou por aeração prolongada. Já em relação ao tipo de fluxo, o sistema por ser contínuo ou intermitente (batelada). O sistema intermitente ou reator em batelada sequencial (RBS) corresponde a uma dessas variantes que tem sido bastante utilizado para remoção de nutrientes (METCALF; EDDY, 2016).

3.2.1.2 Reator em Batelada Sequencial (RBS)

O reator em batelada sequencial (RBS) é um sistema mais compacto que o lodo ativado, pois compreende todas as etapas (tanque de aeração, decantador e recirculação de lodo) em um único tanque. Existem questões específicas sobre o RBS que precisam ser levadas em

consideração, tais como o descarte do lodo, aplicação cinética do processo e a escolha das condições operacionais. O TRS é um fator que precisa ser controlado, ou seja, precisa-se estipular o quanto de lodo será descartado, pois isso poderá afetar a eficiência do processo (METCALF; EDDY, 2016).

O RBS opera por meio de ciclos estabelecidos e repetitivos. Usualmente, os ciclos são dados da seguinte maneira: **enchimento** onde o esgoto bruto entra no reator, **reação** onde ocorre a metabolização da matéria orgânica do esgoto, **sedimentação** para a separação do lodo e do efluente tratado, **descarte** com a saída do efluente tratado e **repouso** para ajuste dos ciclos (VON SPERLING, 2012). A duração de cada ciclo irá depender da necessidade do tratamento, da característica do esgoto e da biomassa no sistema. O TRH em um RBS corresponde ao tempo de metabolização ou reação que o reator irá promover. O lodo excedente pode ser removido ao final da reação ainda como mistura ou diretamente do lodo decantado. Nos casos onde ele é removido como mistura o TRS passa a ser igual ao TRH. Por outro lado, na retirada diretamente do lodo decantado vai depender da concentração de sólidos na mistura do reator e no lodo decantado (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999; VON SPERLING, 2012).

No processo RBS pode existir variações que estão relacionadas tanto a forma de operação quanto a sequência e duração dos ciclos de cada fase do processo. É através da definição dessas variações que se consegue a remoção de nutrientes (VON SPERLING, 2012). A alternância entre fases aeróbia e anóxica pode promover a remoção de nitrogênio e a sequência das etapas anaeróbia e aeróbia favorece a remoção de fósforo (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999; VON SPERLING, 2012).

3.3 REMOÇÃO DE NUTRIENTES E HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS POR PROCESSOS DE TRATAMENTO DE ESGOTO

3.3.1 Remoção de Nutrientes

Devido aos efeitos adversos que o excesso de nutrientes (fósforo e nitrogênio) pode causar no meio ambiente, tendo como principal a eutrofização, busca-se a necessidade de processos de tratamentos de esgoto que sejam eficientes na sua remoção. Dentre os sistemas de tratamentos de esgoto utilizados para a remoção de nutrientes temos os físicos, químicos e biológicos. Porém, os processos físicos e químicos são caros e, com isso, os processos biológicos vem ganhando destaque. Diferentes tipos de tratamento biológicos são empregados, dentre eles temos: RBS, MBR, UCT, A2O, bardenpho e etc. (ROUT et al., 2021).

Para a remoção de nitrogênio, necessita-se de processos que promovam as condições aeróbias e anóxicas. Primeiramente, na fase aeróbia, ocorre a nitrificação, onde as bactérias presentes nesse meio atuam na oxidação do nitrogênio inorgânico (amônia e nitrito) e orgânico produzindo energia e novas células. Na nitrificação, as bactérias (bactéria oxidadoras de amônia – BOA) oxidam a amônia a nitrito, seguido pela nitratação, onde outro grupo de bactérias (bactérias oxidadoras de nitrito – BON) oxidam nitrito a nitrato. Para que se remova o nitrogênio, a desnitrificação deve ser seguida pela nitrificação, necessitando assim de um ambiente anóxico. Não havendo oxigênio livre no meio, o nitrato é utilizado como agente receptor de elétrons no processo de mineralização da matéria orgânica pelas bactérias facultativas. Com isso, o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso e liberado para a atmosfera (METCALF & EDDY, 2016).

Para a remoção de fósforo precisamos das fases anaeróbia e aeróbia seguidas. Jordão e Pessoa (2011) explicam que na fase anaeróbia, onde não há a presença de oxigênio e nitrato, os organismos acumuladores de fósforo (OAFs) assimilam compostos orgânicos (ácidos graxos voláteis) na sua parede celular e liberam os polifosfatos para a fase líquida, elevando a concentração de fósforo nessa fase. Posteriormente, na fase aeróbia, com a presença de oxigênio no meio, as OAFs utilizam os ácidos graxos voláteis que foram armazenados para a produção de energia e reabsorvem os fosfatos do meio formando grânulos de polifosfatos em seu meio intracelular. Na etapa da sedimentação, o fósforo é descartado com a biomassa excedente.

O RBS é um processo em que se pode aplicar todas essas etapas no mesmo reator, sendo assim, é um processo mais compacto, que tem uma menor ocupação de área e tem sido bastante utilizado nos estudos para se remover nitrogênio e fósforo, sendo encontrados valores de remoção na ordem que variam de 71% a 97% de NT e 87% a 99% PT (PAULA, 2017; LIU, et al., 2020; CASTELLANOS et al., 2021b).

3.3.2 Remoção de Hormônios Estrogênicos

Dentre os sistemas de tratamento de esgotos capazes de remover e/ou degradar hormônios destacam-se os processos oxidativos avançados (POA), o uso de carvão ativado e os processos com membranas (BILA; DEZOTTI, 2007). Porém, esses processos demandam altos custos de implantação e operação quando comparados aos processos biológicos.

Assim, o desafio é a busca para encontrar um método biológico adequado para a remoção e/ou degradação desses micropoluentes. Durante o processo de tratamento esses micropoluentes podem sofrer biodegradação, sorção, diluição, dispersão, transformação

abiótica e partição (JELIC et al., 2010) e estes mecanismos dependem das características físico-químicas de cada poluente (BYRNS et al., 2001).

Sendo a biodegradação dos hormônios um dos mecanismos mais relatados, ela pode ocorrer pelo uso direto como doadores de elétrons por meio de organismos heterotróficos onde os microrganismos utilizam desses hormônios como fonte de carbono e energia para o seu crescimento ou por co-metabolismo, onde as bactérias utilizam de suas enzimas para degradar os hormônios (BERNADELLI, 2014). A co-metabolização ocorre principalmente na fase aeróbia do processo, onde as bactérias heterotróficas auxiliam na biodegradação, principalmente do EE2, junto com bactérias oxidadoras de amônia (AOB) pela ação da enzima amônio monooxigenase (VADER et al., 2000; LI et al., 2020). A relação entre a nitrificação durante a remoção de NT e a biodegradação do EE2 também é abordada por alguns autores (JOSS et al., 2003; CLARA et al., 2005; SUÁREZ et al., 2010; HAMID AND ESKICIOGLU, 2012).

Uma grande variedade de tipos de processos biológicos já foram testados para remoção dos hormônios estrogênicos, tais como lodos ativados, reatores UASB, lagoas, valos de oxidação e *wetland* (ESPERANZA et al., 2006; HASHIMOTO et al., 2008; IVANOV et al., 2009; SONG et al., 2009; PESSOA et al., 2014; PETRIE et al., 2014; PAULA, 2017). Os parâmetros que mais variam nos estudos e que mais causam discussão quanto à adequação para uma melhor eficiência de remoção são o tempo de retenção dos sólidos (TRS) ou idade do lodo e o tempo de retenção hidráulica (TRH). Alguns estudos sugerem que um TRS de 3 a 10 dias já é suficiente para a remoção enquanto outros autores defendem que é necessária uma idade maior para se atingir os melhores resultados (HASHIMOTO et al., 2008; KUMAR et al., 2011; PETRIE et al., 2014).

Petrie et al. (2014) estudaram um processo de lodos ativados e conseguiram remoção acima de 90% para os hormônios naturais e 41% para EE2. Pessoa et al. (2014) mostraram alta eficiência de remoção de estrogênios tanto por processos aeróbios como lodos ativados (85% - 100%) quanto os anaeróbios como os reatores UASB (95% - 100%). Logo, os processos aeróbios e anaeróbios podem ser promissores na remoção de hormônios. Paula (2017) observou que a idade do lodo tanto de 10 como de 30 dias não tiveram diferença na eficiência de remoção de 17 α -etinilestradiol no processo RBS. Já Souza (2019) observou uma remoção de 15 e 85% de EE2 e E2, respectivamente, em um RBS com alta idade do lodo (60 dias). A autora sugeriu que possivelmente o E2 estivesse sendo degradado em função da alta idade do lodo, mas isso prejudicou a remoção de EE2 pelo lodo (sorção).

Análises em matrizes de esgoto e lodo são complexas, sendo assim a busca por tecnologias eficazes para sua detecção são de suma importância.

3.4 METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS NO ESGOTO

A determinação do melhor método analítico a ser empregado para detecção e quantificação dos estrogênios é parte essencial desta pesquisa, visto que esses compostos estão em concentrações muito baixas (entre $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) e estão presentes em matrizes complexas (esgoto e lodo). Pesquisadores buscam por um método rápido, que tenha boa sensibilidade, reprodutibilidade e que tenha um custo baixo para determinação desses compostos. Porém, existe certa dificuldade em encontrar um método que determine diversas classes de compostos em apenas uma execução, além do desafio de realizar de forma eficaz o isolamento e extração dos compostos alvo da matriz da amostra, uma vez que podem ser quimicamente reativos ou instáveis por natureza (LAFLEUR et al., 2011). Diferentes métodos analíticos são apontados na literatura para detecção dos hormônios estrogênicos, dentre eles a cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-MS) ou duplo espectrômetro de massas (LC-MS/MS), cromatografia líquida com detector de fluorescência (LC-FL), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), dentre outros (SOUZA, 2019; GOMES, 2018; FANG et al., 2016; PAULA, 2017; GONSCHOROWSKI, 2013; HAMID et al., 2012; BILA, 2005; FILHO et al., 2006). A tabela 3 apresenta alguns métodos utilizados para determinação dos estrogênios em matrizes aquáticas.

Tabela 3. Métodos utilizados para determinação de estrógenos em matrizes aquáticas.

Matriz	Método	Hormônios Estudados		Referências
		Limite de Detecção (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)	
Efluente e Lodo	HPLC-FL	E2 (8,15) e EE2 (9,99); E2 (209) e EE2 (828,5)	E2 (67) e EE2 (94); E2 (58) e EE2 (83)	Souza (2019)
Efluente	HPLC-FL	EE2 (1,1)	EE2 (100 – 108)	Paula (2017)
Efluente	HPLC	E1;E2; E3 e EE2 (0,05 – 0,17)	-	Petrie et al. (2014)
Efluente e Lodo	LC-MS/MS	E1 (0,05) e E2 (0,1); E1 (0,1) e E2 (0,2)	E1 (70,6) e E2 (1,8); E1 (81) e E2 (72)	Shi et al. (2013)
Efluente	GC-MS	E1 (35,38); E2 (11,28); EE2 (1.416,43)	E1 (73,4); E2 (52); EE2 (99)	Pessoa (2012)
Água	GC-MS	E2 e EE2 (5)	E2 e EE2 (>90)	Ferreira (2008)
Água ultrapura	GC	E2 (5)	E2 (>92)	Bila (2005)
Efluente	ELISA	E1 (15 – 2.000) E2 (25 – 2.000) E3 (0,3 – 40)	E1 (>100) E2 (88,3 – 98,6) E3 (87,7 – 98,3)	Swart et al. (2007)
Água	LC/MS	E1 (2,50); E2 (2,50); E3 (5,04); EE2 (3,22)	E1 (100); E2 (98) E3 (94); EE2 (91)	Rodriguez-Mozaz et al. (2004)
Água superficial	GC/MS	E1 (0,28); E2 (0,20) E3 (0,10); EE2 (0,25)	E1 (126,5); E2 (89,8) E3 (111,8); EE2 (87,3)	Nakamura et al. (2001)

Fonte: A autora.

A cromatografia gasosa é um dos métodos mais empregados para detecção de hormônios, porém por esses compostos possuírem uma massa molecular alta e presença de grupos polares, a análise direta por esse método torna-se difícil uma vez que essas moléculas são instáveis sob condições de GC (FERREIRA, 2008). Diante disso, as amostras necessitam ser derivatizadas antes da análise para facilitar a determinação dos compostos, o que aumenta o risco de introduzir erros e problemas técnicos associados a essa técnica de tratamento. Sendo assim, a cromatografia líquida vem ganhando espaço uma vez que não necessita desta etapa reacional e por ser eficiente devido a facilidade de separação do analito de interesse, a capacidade de quantificação, detecção, alta resolução e por se obter a resposta em um período curto de tempo. Porém, sua instrumentação é cara, necessita de um grande volume de amostra e de solventes e o preparo das amostras é dispendioso (FERREIRA, 2008; LAFLEUR et al., 2011).

Dentre as abordagens utilizadas, a mais empregada para detecção é a espectrometria de massas. Isso se deve a menor interferência dos outros compostos presentes nas matrizes e a maior seletividade através da massa do composto de interesse. Porém, a instrumentação é mais complexa e cara se comparado aos detectores padrões utilizados no GC e HPLC (LAFLEUR et al., 2011). Além da espectrometria de massas, outros detectores acoplados ao HPLC podem ser utilizados na detecção de hormônios estrogênicos, tais como índice de refração, ultravioleta, arranjo de diodos, fluorescência, quimiluminescência e eletroquímico (LAFLEUR et al., 2011).

Além desses métodos amplamente empregados, o método ELISA vem ganhando destaque na determinação de hormônios e que foi reconhecido em 2008 pela USEPA (USEPA, 2008). Para que suas moléculas biológicas sejam detectadas é necessária a utilização de antígenos e anticorpos que são marcados com enzimas específicas. O antígeno existente na amostra disputa com o antígeno acoplado a uma enzima pela ligação aos anticorpos que estão presentes no meio (nos poços da microplaca de Elisa). Quando ocorre a ligação deste antígeno ao anticorpo específico, a enzima se solta e cliva um substrato cromogênico resultando numa mudança na cor do meio. Determinados métodos podem utilizar mudanças de cor sensíveis a região do visível ou do UV. Através dessas mudanças de cor pode ser observada a presença ou ausência do antígeno no meio e por intermédio dessa leitura é possível quantificar o hormônio na amostra (MANICKUM & JOHN, 2015). Em seu levantamento bibliográfico, Fang et al. (2016) concluíram que o método ELISA vem se tornando promissor para determinação dos estrogênios, visto que é um método simples, com bom limite de quantificação, rápido, não necessita de volumes altos de amostra e por possuir um bom custo-benefício.

Mesmo com todos os métodos mencionados é importante destacar que as matrizes de esgoto e lodo são complexas e esses hormônios são encontrados em concentrações muito baixas, tornando muitas vezes difícil a sua detecção e quantificação. O aprimoramento das técnicas de extração e purificação é um fator importante para que se possa obter resultados confiáveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONFIGURAÇÃO GERAL DO REATOR

Foram montados dois reatores de 21 L de volume útil como mostra a Figura 8. Eles foram equipados com três bombas peristálticas para alimentação, descarte do efluente tratado e descarte de lodo. Um agitador mecânico foi usado para a mistura do reator auxiliando nas fases anaeróbia e anóxica e um sistema de aeração com difusores porosos de bolha fina promoveu o estágio aeróbio do sistema.

Figura 8. Configuração do RBS.



Fonte: A autora.

A operação do reator ocorreu por meio de uma controladora eletrônica que promoveu ciclos de 12 horas com as seguintes etapas: 30 minutos de enchimento, 2 horas de fase anaeróbia, 3 horas de fase aeróbia, 4 horas de fase anóxica, 2 horas de sedimentação e 30 minutos para esvaziamento. O descarte do lodo sedimentado ocorreu na etapa de esvaziamento. Sondas de oxigênio dissolvido (OD) modelo FDO (marca WTW) e potencial de oxirredução

(ORP) modelo Sensolyt 700 IQ SW (marca WTW) foram acopladas no interior do reator para o monitoramento das etapas metabólicas.

O período de avaliação e aclimatação do sistema foi de aproximadamente 2 meses após o “*star-up*” do reator sem nenhum hormônio nos dois reatores. Após o período de aclimatação o reator operou por mais 4 meses, sendo esses dias distribuídos da seguinte maneira: durante 102 dias, apenas o RBS 1 recebeu hormônios a fim de avaliar o comportamento dos microrganismos no reator e o RBS 2 não recebeu. No 103º dia, o RBS 1 recebeu a sua última inserção de hormônios e o RBS 2 a sua única dopagem. Realizado esse último abastecimento com os hormônios EE2 e E2, os reatores operaram por mais 7 dias recebendo apenas esgoto bruto sem hormônio.

Durante o monitoramento do processo foram coletadas amostras de esgoto bruto e tratado e lodo descartado para as devidas análises de eficiência, controle do processo e de resíduos de hormônios. A avaliação da eficiência dos reatores foi realizada através da quantificação da matéria orgânica (DQO e COD) e de nutrientes (NT e PT) no esgoto bruto (entrada) e tratado (saída). A manutenção da biomassa no reator foi avaliada pela concentração de SSV na mistura do reator. O TRS foi calculado a partir da concentração de SSV no reator e no lodo descartado por ciclo, conforme a equação 1.

$$\text{TRS} = \frac{\text{SSV}_{\text{reator}} \times V_{\text{reator}}}{\text{SSV}_{\text{lodo}} \times V_{\text{lodo}}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde TRS é o tempo de residência de sólidos ou idade do lodo, $\text{SSV}_{\text{reator}}$ é a concentração de sólidos em suspensão voláteis (SSV) no RBS, V_{reator} é o volume do RBS, SSV_{lodo} é a concentração de SSV no lodo descartado e V_{lodo} é o volume do lodo descartado.

A avaliação da remoção dos hormônios estrogênicos foi realizada pelo teste ELISA através da sua concentração no esgoto tratado e no lodo, que será descrita no item 4.4.1.

Para o preparo do esgoto bruto contendo os hormônios (esgoto dopado), foram inicialmente preparadas soluções-estoque dos padrões de hormônios dissolvendo 10 mg de E2 e de EE2 em 10 mL de metanol. Cada 1 mL desta solução foi distribuído em 1 *vial* que foi armazenado à -25°C até o seu respectivo uso. O conteúdo de 1 *vial* foi dissolvido em 1 L de esgoto sintético preparado conforme a Tabela 4, obtendo uma solução nominal de 1 mg L⁻¹ para cada hormônio. Esta solução foi utilizada para o preparo do esgoto bruto sintético que foi

adicionado aos RBS a fim de se obter uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de E2 e EE2 nos experimentos.

Tabela 4. Formulação do esgoto sintético.

CONSTITUINTES	CONCENTRAÇÃO (mg L^{-1})
Peptona de Caseína	250
Extrato de Carne	250
Fosfato Monoácido de Potássio	40
Cloreto de Sódio	10
Ureia	8
Cloreto de Cálcio	10
Sulfato de Magnésio	5

Fonte: HOLLER e TRÖSCH, 2001 com modificações.

Com o propósito de avaliar os mecanismos de remoção dos hormônios por sorção e/ou degradação, somente o RBS 1 recebeu os hormônios desde o início de sua operação. Após 103 dias de processo, o esgoto com hormônio (concentração nominal de E2 e EE2 de $5 \mu\text{g L}^{-1}$) foi adicionado em ambos os reatores. Esta foi a última entrada de hormônios no RBS 1 enquanto que o RBS 2 recebeu somente esta adição de hormônios. Após esta adição, os reatores foram alimentados com esgoto sintético sem hormônio e foi realizado um monitoramento dos resíduos de E2 e EE2 no esgoto tratado e no lodo descartado por 7 dias (13 ciclos subsequentes). Uma amostra do esgoto sintético com hormônio também foi retirada para a análise da concentração real de E2 e EE2 que foi adicionada ao processo.

4.2 PARÂMETROS DE CONTROLE

4.2.1 Demanda Química de Oxigênio e Carbono Orgânico Dissolvido

O teste para se obter a DQO foi elaborado através da oxidação química da matéria orgânica por meio do dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_7$), que é um agente oxidante forte, em meio ácido e com alta temperatura ($150 \text{ }^\circ\text{C}$) (APHA, 2017).

Foram colocados em um tubo para DQO 2,0 mL de amostras de esgoto bruto ou tratado, 1,5 mL da solução digestora (dicromato de potássio com sulfato de mercúrio e ácido sulfúrico)

e 2,8 mL da solução catalítica (ácido sulfúrico com sulfato de prata). Um bloco digestor a uma temperatura de 150 °C foi utilizado para que fosse realizada a reação de DQO num período de 2 horas. Concluída a digestão da amostra, o tubo foi resfriado a temperatura ambiente (25°C) e por fim, a absorbância foi lida em um espectrofotômetro à 600 (para DQO na faixa entre 100 e 900 mg L⁻¹) ou 420nm (para DQO na faixa entre 10 e 90 mg L⁻¹). Para a determinação da DQO da amostra o resultado foi calculado por meio de uma curva de calibração (APHA, 2017).

Para análise do carbono orgânico dissolvido (COD) as amostras do esgoto bruto e do tratado foram previamente filtradas em membrana de 0,45 µm e se utilizou o Analisador de Carbono Orgânico Total, modelo TOC – L (marca Shimadzu). O equipamento utiliza combustão catalítica a 680 °C para analisar os compostos orgânicos e fornecer as concentrações em mg L⁻¹. O limite de quantificação mínimo é de 9 mg L⁻¹.

4.2.2 Nitrogênio Total

As análises de nitrogênio total (NT) foram realizadas em duplicata utilizando as amostras do esgoto bruto e tratado. Essa análise foi realizada no equipamento modelo TOC – L (marca Shimadzu) e, para isso, as amostras de esgoto bruto e tratado foram previamente filtradas por membrana de nylon de 0,45 µm.

4.2.3 Fósforo Total

As análises de fósforo total (PT) foram realizadas em triplicata utilizando as amostras do esgoto bruto e tratado. Foi utilizada a metodologia de Chen et al. (1956) com modificações.

Em um tubo de 20 mL foram adicionados 1,0 mL de amostra e 0,5 mL de solução reativa de digestão (mistura 5:1 de ácido nítrico e sulfúrico). A reação nos tubos ocorreu em um bloco digestor à 250°C e o seu final foi marcado pelo desaparecimento da coloração alaranjada nos tubos. Realizada a digestão, o tubo foi resfriado a temperatura ambiente (25 °C), sendo adicionado 5,0 mL de água ultrapura e 5,0 mL de reativo de coloração (solução com ácido ascórbico, molibdato de amônio e ácido sulfúrico) e homogeneizado. Posteriormente, os tubos foram levados a uma estufa à 37°C por 2 horas. Por fim, a absorbância foi lida em um espectrofotômetro à 825nm e o resultado foi obtido a partir de uma curva de calibração previamente elaborada.

4.2.4 Sólidos Suspensos Voláteis

Para que se pudesse determinar os SSV foi preparado cadinhos de porcelana com uma membrana de microfibras de vidro que foi levado a um forno mufla a 550 ± 50 °C por 1 hora. Feito isso, o conjunto foi esfriado em dessecador (cadinho + membrana) e pesado em balança analítica sendo anotada a massa do conjunto em gramas (P_0). Foram filtrados 5 mL de amostra (mistura do reator ou lodo) através da membrana preparada e recolocada no cadinho, e o conjunto foi levado a uma estufa a 103-105 °C por 24 horas. Posteriormente, o conjunto foi colocado para esfriar em um dessecador e depois pesado em balança analítica sendo anotada a sua massa (P_1). Realizado esse procedimento, o conjunto foi levado ao forno mufla 550 ± 50 °C por 1 hora para que a matéria orgânica pudesse ser calcinada e, em seguida, deixado para esfriar no dessecador. Por fim, foi determinada a sua massa em balança analítica (P_2). O cálculo do teor de SSV na amostra foi determinado pela equação 2 (APHA, 2017).

$$SSV_{amostra} = \left(\frac{(P_1 - P_0) - (P_2 - P_0)}{V} \right) \times 10^6 \quad \text{Equação 2}$$

Onde $SSV_{amostra}$ é a concentração de SSV na amostra (mistura do RBS ou lodo descartado), P_1 é o peso do sistema cadinho e membrana após a filtração da amostra e secagem por 103-105°C, P_0 é o peso do sistema cadinho e membrana preparada, P_2 é o peso do sistema cadinho e membrana após a filtração da amostra e secagem por 500-600°C e V é o volume de amostra.

4.2.5 Turbidez

A análise de turbidez do esgoto tratado foi realizada em triplicata em um turbidímetro modelo 2100 P (marca Hach).

4.3 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO

Para se avaliar o possível impacto dos hormônios no RBS foi realizada a determinação da taxa de consumo de oxigênio (TCO) nos reatores. Este valor foi obtido a partir da subtração do maior valor de OD encontrado na etapa aeróbia e o menor valor de OD medido na etapa subsequente (anóxica). Esta diferença no tempo que levou para que isso ocorresse representa a TCO, como mostra a equação 3.

$$TCO = \frac{OD_{m\acute{a}x} - OD_{m\acute{i}n}}{\Delta t} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 3}$$

Onde **TCO** é a taxa de consumo de oxigênio, **OD_{máx}** é o maior valor de oxigênio dissolvido encontrado na etapa aeróbia, **OD_{min}** é o menor valor de oxigênio dissolvido encontrado no início da fase estacionária da etapa anóxica e **Δt** é a variação de tempo.

4.3.1 Taxa de consumo de oxigênio específica

A taxa de consumo de oxigênio específica corresponde ao valor de oxigênio dissolvido por uma determinada biomassa no reator e expressa com maior especificidade o provável impacto de determinado contaminante nos reatores biológicos (VAN HAANDEL & MARRAIS, 1999). Para determinar o seu valor foi realizada a razão entre a TCO e a concentração de SSV correspondente ao dia e ciclo de onde foi obtido a TCO como mostra a Equação 4.

$$TCO_{spec.} = \frac{TCO}{SSV} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 4}$$

Onde **TCO_{spec.}** é a taxa de consumo de oxigênio específica, **TCO** é a taxa de consumo de oxigênio e **SSV** são os sólidos suspensos voláteis.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS

4.4.1 ELISA

O teste ELISA foi realizado de acordo com o guia do usuário fornecido pelo fabricante (marca Abraxis). O anticorpo monoclonal somado com o hormônio de interesse foi ligado exclusivamente a esse hormônio, não havendo reação cruzada com outros produtos químicos de estruturas semelhantes. O kit tem sensibilidade analítica quantitativa de 0,05 a 3 µg L⁻¹ para EE2 e de 0,05 a 1 µg L⁻¹ para E2. O coeficiente de variação é inferior a 10%. O tempo total para medição foi de 2,5 horas.

Esta metodologia é caracterizada por ser um teste competitivo, sendo baseada no reconhecimento dos hormônios estrogênicos por anticorpos monoclonais. Este hormônio presente na amostra compete com o hormônio conjugado à enzima peroxidase através da ligação dos anticorpos monoclonais anti (hormônio de interesse), que por sua vez, foram impregnados nos poços da microplaca. O teste é direto, pois quando não houver ou a concentração do estrógeno for muito baixa, ou seja, for abaixo do limite de quantificação, a interação com os anticorpos ocorrerá pelos hormônios da solução conjugada. Este processo gera uma enzima na forma livre que interage com um substrato cromogênico (tetrametilbenzidina) que catalisará a conversão do substrato para um produto colorido. Quanto maior a concentração do hormônio na amostra menor será o número de conjugado antígeno-enzima ligado ao anticorpo no poço da microplaca, isso irá gerar uma coloração mais clara, ou seja, menor absorvância (LUCENA, 2013).

Em relação a análise quantitativa, a curva padrão e uma curva dose-resposta obtida de concentrações conhecidas dos padrões dos hormônios foram determinadas a partir da absorvância a 450 nm. A concentração do hormônio em cada amostra foi calculada com precisão através da interpolação usando a intensidade de absorvância obtida a partir da curva padrão.

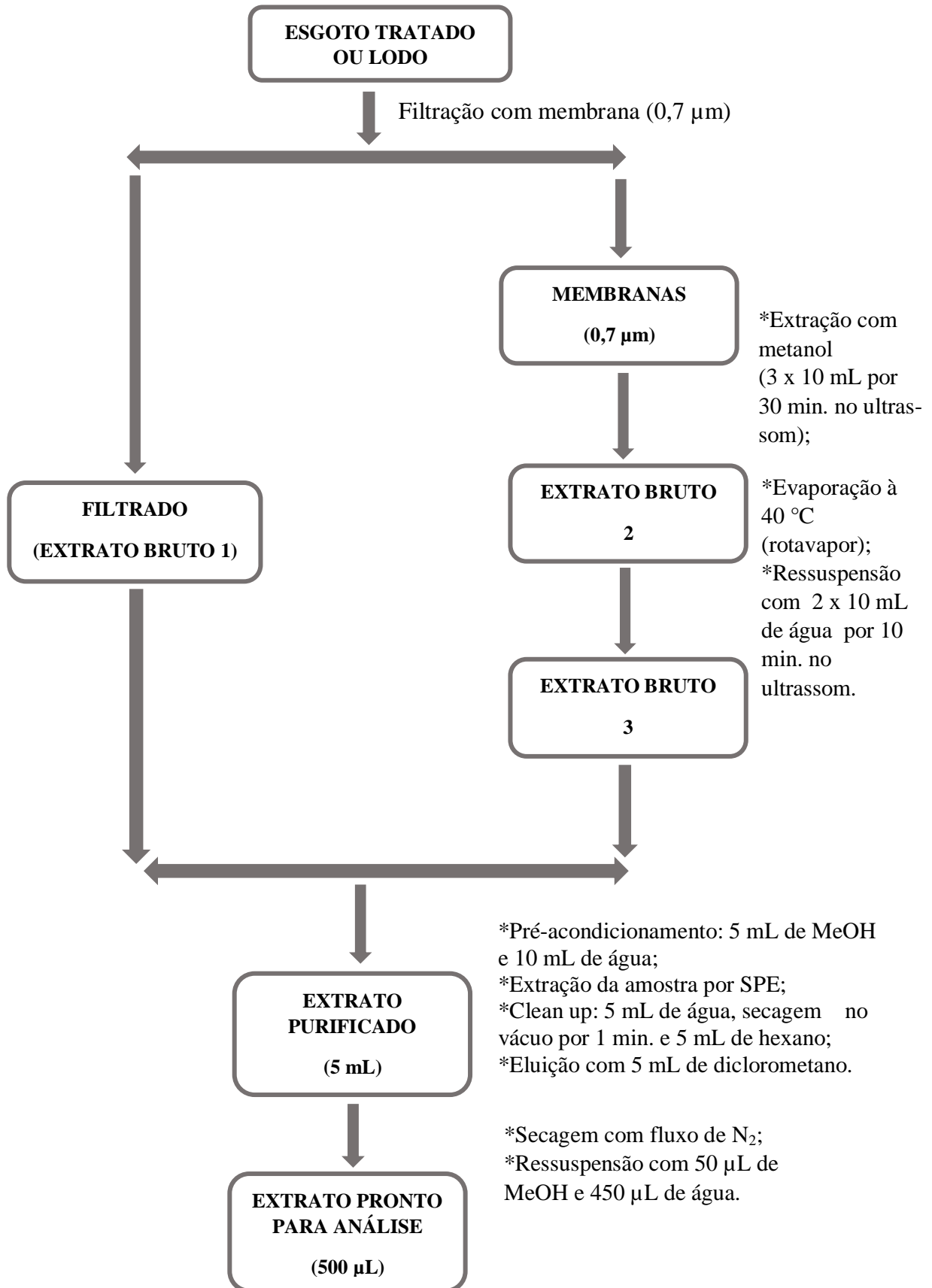
4.4.1.1 Extração e Purificação das Amostras

A metodologia de pré-tratamento das amostras (esgoto e lodo) seguiu as recomendações do fabricante (marca Abraxis). Sendo assim, para aumentar o limite de quantificação do método analítico e pressupondo a concentração que seria encontrada em cada amostra, o volume filtrado tanto do esgoto tratado como do lodo variou. Inicialmente, o pH das amostras foi aferido a fim de se garantir que estivesse na faixa entre 5 e 8. Devido as matrizes analisadas (esgoto tratado, bruto e lodo) possuírem aspectos heterogêneos, todas as amostras foram submetidas a um pré-tratamento.

Quantificado o volume das amostras, as mesmas foram filtradas em membrana de fibra de vidro (0,7 μm de diâmetro). Terminado o processo de filtração, a fim de recuperar os hormônios adsorvidos nas membranas, estas foram lavadas com 10 mL de metanol no ultrassom por 30 minutos, esse processo se repetiu por 3 vezes. Os extratos dos filtros foram levados a secar em um evaporador rotativo e, em seguida, ressuspensos com 20 mL de água ultra pura para que o eluente fosse incorporado ao filtrado. Feito isso, foi realizado a extração por fase sólida utilizando um cartucho C18 (1.000 mg/6 mL) pré-acondicionado com 5 mL de metanol

e 10 mL de água destilada. Passado as amostras, o cartucho foi lavado com 5 mL de água destilada, seco sob vácuo por 1 minuto e lavado novamente com 5 mL de hexano. Os hormônios foram eluídos com 5 mL de diclorometano. A amostra eluída foi evaporada em fluxo de N₂. O resíduo foi ressuscitado em 50 µL de metanol, misturado no vortéx por 1 minuto e adicionado 450 µL de água destilada, tendo um volume final de 500 µL. Feito isso, a amostra foi analisada pelo ELISA. A Figura 9 esquematiza o processo de preparação da amostra.

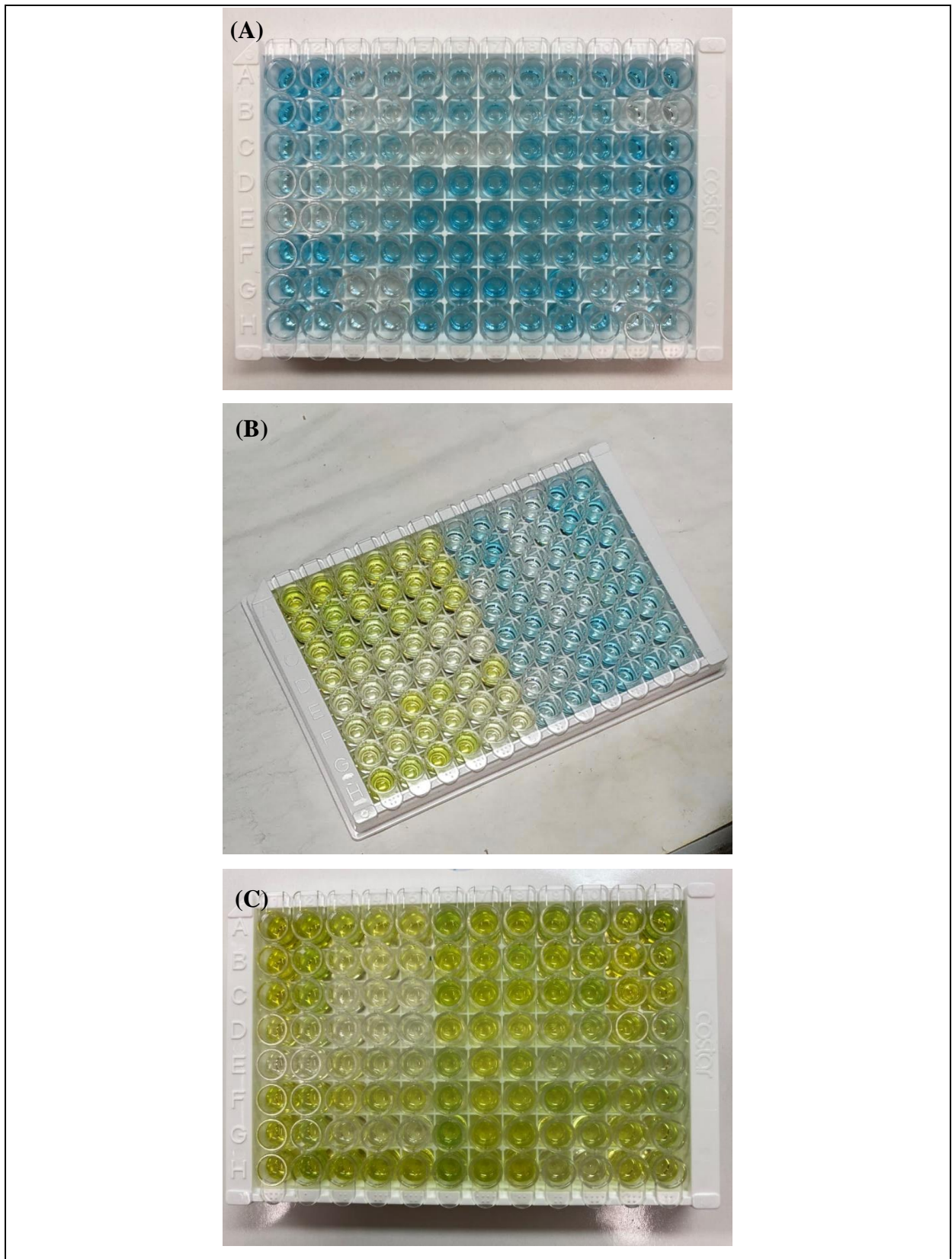
Figura 9. Procedimento de preparação das amostras.



4.4.2 Kit ELISA

O pó conjugado antígeno-enzima foi restabelecido com a solução tampão do kit ELISA (marca Abraxis). Foi adicionado aos poços da placa uma mistura de 100 µL da solução conjugada com 100 µL dos padrões dos hormônios ou com 100 µL das amostras. A placa foi incubada por 60 minutos à temperatura ambiente (24° C). Após a incubação, foi preparada uma solução com diluição de 17 mL de solução de lavagem do kit ELISA com 85 mL de água destilada para realizar a lavagem da placa com 300 µL. Este procedimento foi realizado por meio de uma lavadora de placas modelo Stat Fax – 2600 (marca Awarni) por três vezes. Posteriormente, foi adicionado 100 µL da solução colorida do kit ELISA em cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente (24° C) por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada à solução de parada do kit para que se pudesse concluir a reação. Por fim, foi realizada a leitura da placa com absorvância a 450 nm, através da leitora de placas modelo EZ Read 400 Research (marca Biochrom). As etapas de preparação da placa podem ser observadas na Figura 10.

Figura 10. Placa de ELISA após o período de incubação (A), durante a adição da solução de parada (B) e após a adição da solução de parada pronta para leitura (C).



Fonte: A autora.

4.4.2.1 Curva de Calibração e Teste de Recuperação

Para elaboração da curva de calibração foram feitos 5 pontos com diferentes concentrações de padrões já prontos do próprio kit. Para o E2 as concentrações foram de 0; 0,05; 0,15; 0,4 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o EE2 foram de 0; 0,05; 0,15; 0,5 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Obtidos os valores de absorbância de cada ponto, foi calculada a taxa de inibição em escala logarítmica ($\log(B/B_0)$) conforme a equação 5. A partir das concentrações e dos valores da taxa de inibição foi traçada a curva de calibração (Conc x $\log(B/B_0)$).

$$\log(B/B_0) = \log\left(\frac{\text{Abs}(C)}{\text{Abs}(C_0)}\right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde $\log(B/B_0)$ é a taxa de inibição, $\text{Abs}(C)$ é a absorvância do padrão de hormônio em determinada concentração e $\text{Abs}(C_0)$ é a absorvância do padrão sem inibição, ou seja, na concentração 0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para avaliar o efeito da matriz foram traçadas 3 curvas desses mesmos padrões ressuspendidos na matriz (esgoto tratado ou lodo). A partir dos valores de taxa de inibição média foi obtida a curva de calibração na matriz. As concentrações dos hormônios nas amostras e na determinação do percentual de recuperação foram realizadas a partir desta curva na matriz utilizando a sua equação da reta.

O percentual de recuperação dos hormônios na matriz foi realizado através da equação 6:

$$R\% = \left(\frac{C_m}{C_{ad}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde $R\%$ é o percentual de recuperação, C_m é a concentração média da amostra recuperada processada e C_{ad} é a concentração real adicionada à matriz.

4.4.3 HPLC-DAD

4.4.3.1 Preparo das Soluções

As soluções-estoque dos padrões de hormônios foram preparadas a partir da massa de 10 mg de E2 e de EE2 dissolvidos em 10 mL metanol (concentração de 1.000 mg L^{-1}). Esta solução foi distribuída em 10 *vials* (1 mL em cada) e armazenados à -25°C até o seu uso. Cada *vial* foi utilizado para o preparo dos padrões.

A construção da curva de calibração e as curvas para a determinação dos limites de detecção e de quantificação foram preparadas a partir da solução-estoque de padrões com concentrações de 0,1 a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ avolumados com fase móvel (50:50 de acetonitrila e água).

4.4.3.2 Extração e Purificação das Amostras

A extração e purificação das amostras para o HPLC foi a mesma realizada na metodologia do ELISA descrita no item 4.4.1.1 acima.

4.4.3.3 Condições Cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Performance com Detector de DAD (HPLC-DAD) modelo 1200 Series (marca Agilent) utilizando uma coluna de separação Eclipse Plus C18 $5 \mu\text{m}$, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno (marca Agilent). Foi utilizada eluição isocrática com ACN:H₂O 50:50 (v/v) acidificada com H₃PO₄ e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A detecção por DAD utilizada possuiu comprimento de 281 nm.

4.4.3.4 Curva de Calibração, Limites de Detecção e de Quantificação e Teste de Recuperação

Para realização da curva de calibração foi elaborado um gráfico entre as médias das áreas obtidas a partir da injeção de 5 padrões de concentrações diferentes de E2 e EE2 (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$). Através desse gráfico pode-se obter o coeficiente de regressão linear (R^2) e a equação da reta.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram elaborados com a adição de diferentes concentrações dos padrões E2 e EE2 (0,0; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg L⁻¹) ao extrato purificado da matriz (esgoto tratado ou de lodo). Para isso, 100 µL destes extratos em um *vial* com *insert* foram levados à secura e posteriormente foram ressuspensos com as diferentes concentrações dos hormônios estrogênicos. A realização deste procedimento foi feita em triplicata. Após a corrida cromatográfica foram elaboradas 3 curvas dos padrões no extrato sendo obtidos os seus coeficientes lineares da reta. Os LD e LQ foram calculados a partir das equações 7 e 8, respectivamente (SKOOG et al., 2014).

$$LD = \left(\frac{bm}{a}\right) \times 3,3 \quad \text{Equação 7}$$

$$LQ = \left(\frac{bm}{a}\right) \times 10 \quad \text{Equação 8}$$

Onde **LD** é o limite de detecção, **LQ** é o limite de quantificação, **bm** é o desvio padrão dos coeficientes lineares das 3 curvas obtidas dos padrões na matriz (esgoto tratado ou lodo) e **a** é o coeficiente angular da curva média dos padrões na matriz.

Para determinar o percentual de recuperação do método, foi realizada a diluição de um *vial* armazenado com solução-estoque (1 mg L⁻¹) em 1 L de esgoto tratado. Esta solução foi armazenada por 1 dia à 4°C e, em seguida, 3 alíquotas de 250 mL da amostra com os hormônios foram filtradas e processadas pela mesma metodologia de extração e purificação utilizada pelo ELISA. A concentração dos hormônios estrogênicos foi calculada pela curva de calibração na matriz e o percentual de recuperação (R%) foi determinado através da equação 9.

$$R\% = \left(\frac{C_{ob}}{C_{ad}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Onde R% é o percentual de recuperação, C_{ob} é a concentração média obtida pelos cromatogramas e C_{ad} é a concentração real que foi adicionada na matriz (esgoto tratado ou lodo).

4.5 CÁLCULO DO BALANÇO DE MASSAS DOS HORMÔNIOS

O balanço de massas para E2 e EE2 foi calculado a partir da última adição dos hormônios ao processo (103º dia de processo). A quantidade em massa de hormônios que entrou

no processo foi determinada a partir da análise das suas concentrações reais no esgoto bruto. O cálculo de massa de hormônios (E2 e EE2) que foi adicionado ao processo foi realizado de acordo com a equação 10. A quantidade mássica de hormônios que saiu pelo esgoto tratado ou pelo lodo descartado foi determinada pela equação 11. O percentual relativo em massa que saiu pelo esgoto tratado ou pelo lodo descartado em cada um dos 13 ciclos após o 110º dia de processo foi calculado utilizando a equação 12. O percentual total de hormônios que saiu com o esgoto tratado ou com o lodo descartado nos 13 ciclos foi determinado utilizando a equação 13.

$$Mentrada = C_{afl} \times V \quad \text{Equação 10}$$

$$Msaída = Csaída \times V1 \quad \text{Equação 11}$$

$$PRsaída = \frac{Msaída}{Mentrada} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

$$PTsaída = \sum_0^{13} PRsaída \quad \text{Equação 13}$$

Onde **Mentrada** é a massa de hormônio (E2 ou EE2) que entrou no RBS, **C_{afl}** é a concentração do hormônio (E2 ou EE2) no esgoto bruto (afluente), **V** é o volume de esgoto bruto no processo, **Msaída** é a massa de hormônio (E2 ou EE2) que saiu com o esgoto tratado ou lodo descartado, **Csaída** é a concentração de hormônio (E2 ou EE2) que saiu com o esgoto tratado ou lodo descartado, **V1** corresponde ao volume de esgoto tratado ou lodo descartado, **PRsaída** é o percentual relativo à massa de hormônio (E2 ou EE2) que saiu pelo esgoto ou lodo descartado; **PTsaída** é o percentual total de hormônios (E2 ou EE2) que saiu pelo esgoto tratado ou pelo lodo descartado.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R versão 4.2.1. Para avaliar a distribuição normal das amostras foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para as amostras que apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste *t*-Student pareado para comparação de médias. No caso das amostras que não apresentaram distribuição normal foi

aplicado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Todos os testes utilizaram um intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESEMPENHO DOS REATORES

5.1.1 Oxigênio Dissolvido (OD) e Potencial de Oxirredução (ORP)

Os dados de OD e ORP foram monitorados durante todo o funcionamento do processo para que se obtivesse as etapas metabólicas bem definidas, como mostra a Tabela 5. Tanto OD quanto o ORP apresentaram um comportamento similar nos dois reatores, o que pode ser observado na Figura 11.

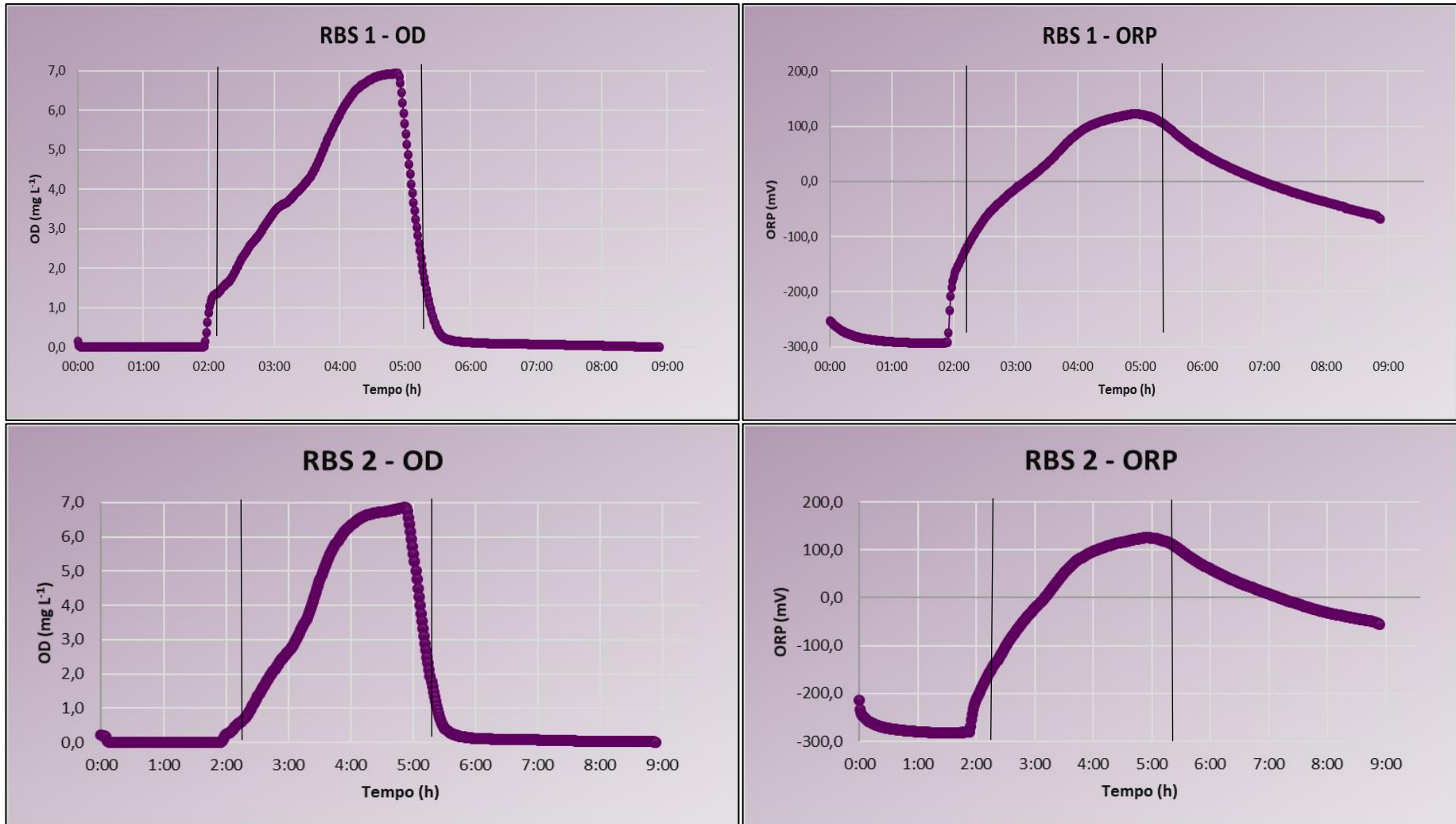
Tabela 5. Valores de OD e ORP em cada etapa metabólica do processo.

			Média	Mínimo	Máximo
RBS 1	OD (mg L⁻¹)	Anaeróbia	0,0	0,0	0,9
		Aeróbia	4,4	0,9	6,9
		Anóxica	0,4	0,0	5,7
	ORP (mV)	Anaeróbia	-282,1	-173,1	-293,2
		Aeróbia	22,8	-166,6	122,6
		Anóxica	13,1	-68,6	122,1
RBS 2	OD (mg L⁻¹)	Anaeróbia	0,0	0,0	0,2
		Aeróbia	4,2	0,2	6,9
		Anóxica	0,4	0,0	5,7
	ORP (mV)	Anaeróbia	-272,4	-212,4	-282,3
		Aeróbia	17,5	-208,0	125,5
		Anóxica	20,6	-55,6	125,0

Fonte: A Autora.

Observa-se um aumento gradativo nos valores de OD ao longo da fase aeróbia seguido de um rápido decaimento na fase anóxica. Os valores médios de OD no RBS 1 na fase aeróbia foi de 4,4 mg L⁻¹ e no RBS 2 foi de 4,2 mg L⁻¹, já na fase anóxica a média foi de 0,4 mg L⁻¹ nos dois reatores.

Figura 11. Valores médios do monitoramento de oxigênio dissolvido (OD) e potencial redox (ORP) realizado pelas sondas nos ciclos dos RBS.



Fonte: A Autora.

Quanto ao ORP, podemos ver mais claramente as etapas metabólicas definidas, obtendo uma média no RBS 1 na fase anaeróbia de -282,1 mV e no RBS 2 de -272,4 mV. Durante a fase aerada os valores ficaram acima de 100 mV, o que vai de acordo com Gerardi (2003) que sugeriu valores acima de 50 mV indicando que os microrganismos estão realizando respiração aeróbia. Ainda segundo Gerardi (2003), na fase anóxica, o ORP tende a variar na faixa entre -50 e +50 mV. As médias de ORP obtidas nos RBS 1 e 2 foram respectivamente de 13,1 e 20,6 mV, ficando dentro dessa faixa recomendada para a atividade metabólica.

5.1.2 Concentração de Biomassa

A concentração média de biomassa (SSV) no RBS 1 foi de 4.942 mg L⁻¹ e no RBS 2 de 5.435 mg L⁻¹ como mostra a Tabela 6. Mesmo os menores valores de SSV nos reatores foram acima dos recomendados por von Sperling (2012) e van Haandel e Marais (1999) para um sistema de lodos ativados por aeração prolongada. Estes valores prejudicam a taxa de transferência de oxigênio no processo (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999). No entanto, esta dificuldade não refletiu nos valores de OD obtidos ao longo do ciclo (Figura 11) e, inclusive, favoreceu a manutenção dos valores de ORP durante as 4 horas de fase anóxica. A relação SSV/SST no RBS 1 e 2 ficou em média de 84% e 83%, respectivamente. Estes valores estão próximos ao recomendado para um sistema por lodos ativados com aeração prolongada que são na faixa de 70 a 85% (VON SPERLING, 2012). Não foram encontrados estudos na literatura que tenham abordado resultados de biomassa e relação SSV/SST em RBS que operaram com ciclos metabólicos mistos para efeito de comparação dos resultados.

O tempo de retenção de sólidos (TRS) nos reatores não foi fixo, porque o volume descartado de lodo variou a depender da concentração de biomassa que os reatores apresentavam, a fim de evitar uma perda excessiva de sólidos. A média encontrada do TRS no RBS 1 foi de 61 dias e no RBS 2 foi de 54 dias, enquanto que a mediana desses valores nos dois reatores foi de 51 dias. PAULA (2017) demonstrou que não houveram diferenças na eficiência dos reatores variando o TRS em idades baixas (10 dias) e altas (30 dias). Sendo assim, os RBS mantiveram suas eficiências mesmo não tendo sido possível a fixação de TRS como será mostrado mais adiante.

Tabela 6. Valores da concentração de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sua relação na biomassa dos RBS 1 e RBS 2.

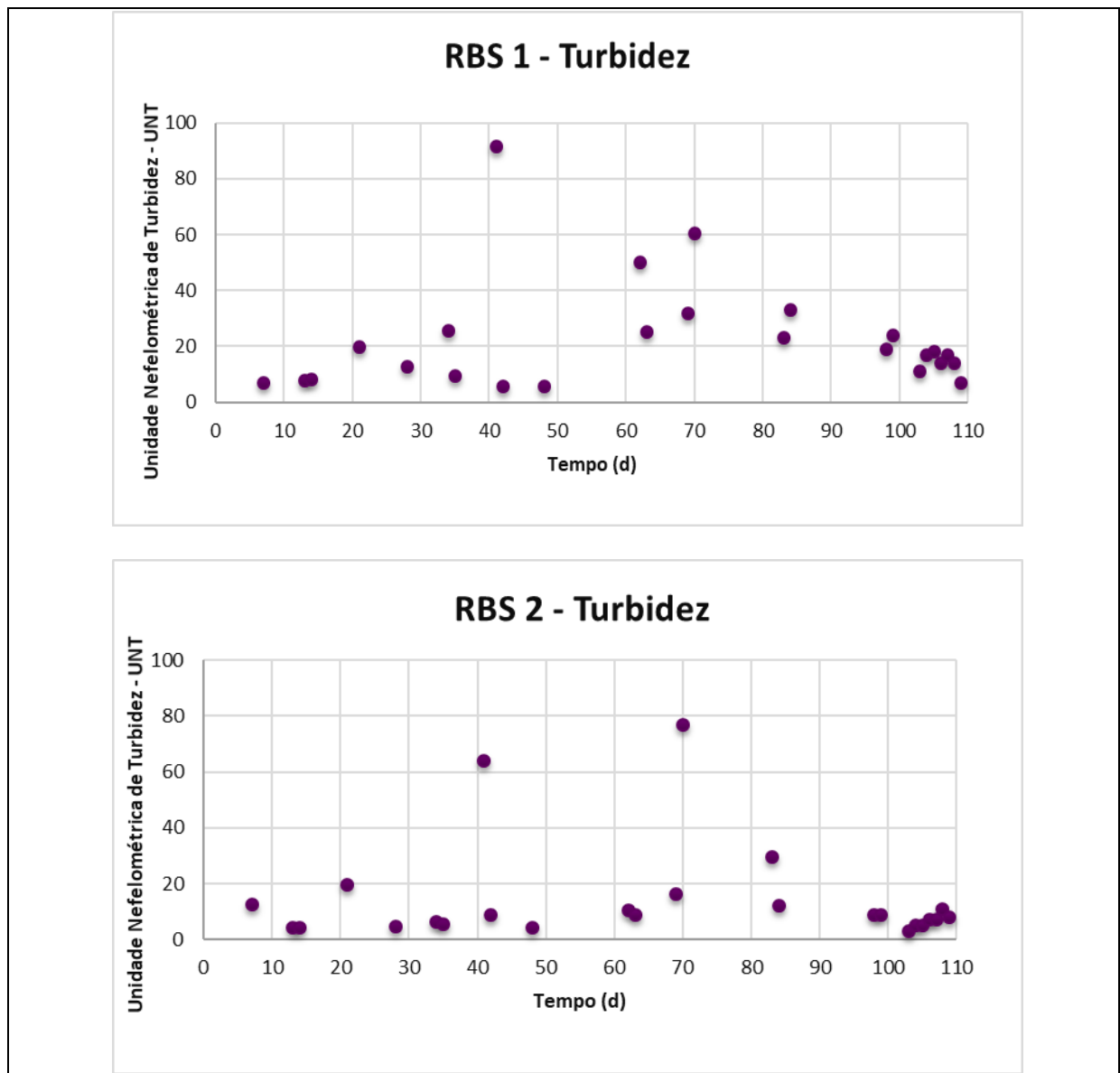
	RBS 1			RBS2		
	SST (mg L ⁻¹)	SSV (mg L ⁻¹)	SSV/SST (%)	SST (mg L ⁻¹)	SSV (mg L ⁻¹)	SSV/SST (%)
Média	5868	4942	84	6525	5435	83
Mediana	5590	4725	85	6575	5530	84
Mínimo	4270	3460	75	5430	4060	74
Máximo	8310	7020	88	8220	6800	90
Coef. Var.	0,22	0,23	0,04	0,12	0,15	0,05

Fonte: A Autora.

Em relação a turbidez apresentada nos reatores, podemos observar que algumas alterações pontuais ocorreram elevando os valores em alguns dias, como pode ser observado na Figura 12. Tal comportamento pode ter ocorrido devido as oscilações experimentais que geralmente acontecem em reatores biológicos. Em média, a turbidez no RBS 1 foi de 22 UNT e no RBS 2 foi de 14 UNT.

A partir da análise estatística desses resultados, os dois RBS não foram iguais significativamente em relação a turbidez do esgoto tratado e da concentração de biomassa, como pode ser observado na Tabela 7. Apesar dos dois reatores terem sido eficientes, o valor da turbidez foi um pouco mais elevado no RBS 1. Castellanos et al. (2021b) observaram que com a entrada desses mesmos hormônios em seu reator de lodo granular aeróbio impactou a sua eficiência sendo necessário alguns dias para a recuperação de sua eficiência. Como o valor de turbidez no esgoto tratado foi um pouco mais elevado, a concentração de biomassa no RBS 1 sofreu uma leve redução em relação ao RBS 2 que não recebeu hormônios por muito tempo.

Figura 12. Valores de turbidez no efluente tratado nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo de todo o período de funcionamento do processo.



Fonte: A Autora.

Tabela 7. Testes estatísticos de comparação entre RBS 1 e RBS 2 em relação a sua concentração de biomassa (SSV) e turbidez do esgoto tratado.

Parâmetros Analisados	Indicador Estatístico
Biomassa	t = - 4,15
Turbidez	p = 0,02

Nota: “p” se refere ao *p*-valor encontrado no teste de wilcoxon e “t” ao valor encontrado no teste *t*-Student. A hipótese nula foi RBS1 = RBS2; para valores de *p* > 0,05 e t entre -2,06 e +2,06, se aceita a hipótese nula;

Fonte: A Autora.

5.1.3 Taxa de Consumo de Oxigênio (TCO) e Taxa de Consumo de Oxigênio Específica (TCOespec.)

A TCO média tanto no RBS 1 como no RBS 2 antes de receberem os hormônios EE2 e E2 foi de 11,5 mgO₂/L. h e a TCOespec. média foi de 0,0019 mgO₂/mg SSV. h também nos dois reatores. No RBS 1, a TCO e a TCO específica aumentaram após a inserção dos hormônios, encontrando valores médios de 14,10 mgO₂/L.h e 0,0031 mgO₂/mgSSV.h, respectivamente. Esses valores indicam que possivelmente os hormônios promoveram uma melhor metabolização aeróbia no reator, visto que apresentaram uma TCO e TCOespec. maiores após a sua introdução no sistema anaeróbio/ aeróbio/ anóxico. Esta observação foi diferente a relatada por Castellanos et al. (2021b) que sugeriram um provável impacto dos hormônios em um processo por lodo granular aeróbio. Esta diferença pode ser atribuída as fases metabólicas que foram utilizadas no presente estudo sendo iniciada pela anaerobiose.

Não foram realizados cálculos de TCOespec. no RBS 2 pós introdução dos hormônios (no centésimo terceiro dia de processo) visto que não foram feitas análises de SSV neste sistema nos últimos dias de processo a fim de se garantir que não houvesse interferência nos valores de concentração dos hormônios durante o monitoramento de seus resíduos no esgoto tratado e no lodo descartado.

5.1.4 Redução de Matéria Orgânica

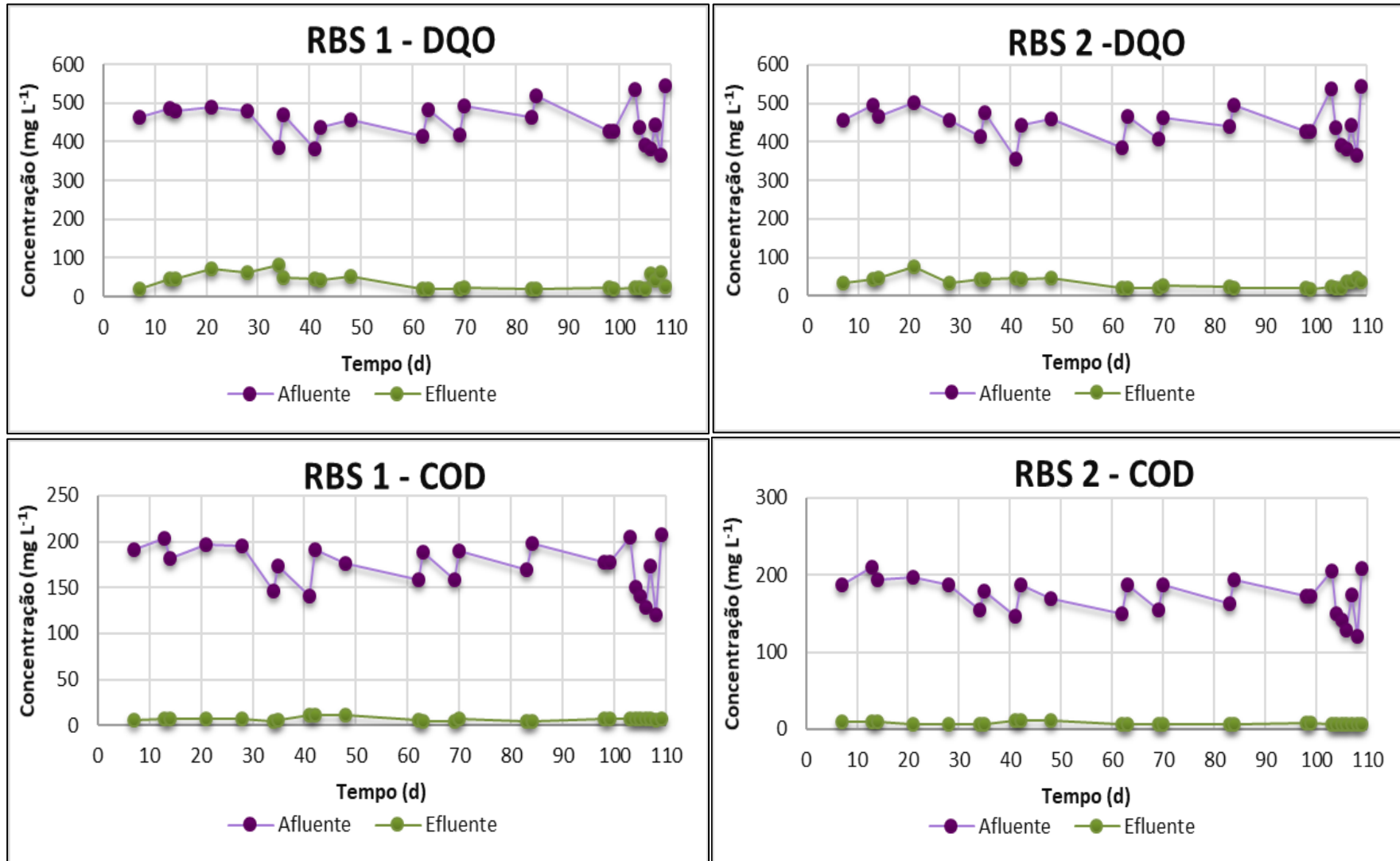
As concentrações médias de DQO no esgoto bruto e tratado no RBS 1 foram respectivamente de 451 e de 38 mg L⁻¹. Já os de COD foram de 174 e 7 mg L⁻¹, respectivamente. No RBS 2 as concentrações médias de DQO e COD no esgoto bruto foram respectivamente de 445 e 173 mg L⁻¹ e no esgoto tratado foram de 34 e 8 mg L⁻¹, respectivamente. A variação desses valores ao longo de todo o processo nos RBS está representada na Figura 13.

Em relação à eficiência de redução média de matéria orgânica, o RBS 1 teve uma redução de 91% e o RBS 2 de 92 % em termos de DQO e ambos de 96% em termos de remoção de COD como pode ser observado na Tabela 8.

Apesar dos reatores mostrarem eficiência similar em relação a redução de matéria orgânica, eles apresentaram desempenhos estatisticamente diferentes em relação a remoção de COD como mostra a Tabela 9. O teste Wilcoxon é recomendado para amostras que não tiveram distribuição normal (teste não paramétrico) e que compara as medianas dos valores. No entanto,

a média e a mediana de remoção de COD em ambos os reatores tiveram valores iguais (96%), logo o teste pode não estar expressando a realidade dos experimentos.

Figura 13. Concentrações afluentes e efluentes de matéria orgânica (DQO e COD) nos reatores RBS 1 e RBS 2 (n=25).



Nota: n = número de amostras.

Fonte: A Autora.

Tabela 8. Eficiência de redução de matéria orgânica (DQO e COD) e remoção de nutrientes (NT e PT) nos reatores RBS 1 e RBS 2 (n=25).

PARÂMETROS		EFICIÊNCIA (%)	
		RBS 1	RBS 2
DQO	Média	91	92
	Mínimo	79	85
	Máximo	96	96
	Desvio Padrão	5	3
COD	Média	96	96
	Mínimo	92	93
	Máximo	98	97
	Desvio Padrão	2	1
NT	Média	80	81
	Mínimo	71	74
	Máximo	86	87
	Desvio Padrão	5	4
PT	Média	79	71
	Mínimo	44	29
	Máximo	93	93
	Desvio Padrão	13	20

Nota: n = número de amostras.

Fonte: A Autora.

Tabela 9. Dados estatísticos referentes a igualdade significativa em termos de eficiência entre os reatores RBS 1 e RBS 2 em relação a DQO, COD, PT e NT.

Parâmetros Analisados (Efic%)	Indicador Estatístico
DQO	p = 0,20
COD	p = 0,02
PT	p = 0,01
NT	t = -2,16 ou p = 0,06

Nota: onde “p” se refere ao p-valor encontrado no teste de wilcoxon ($p > 0,05$) e “t” ao valor encontrado no teste t-Student ($-2,064 < t < 2,064$).

Fonte: A Autora.

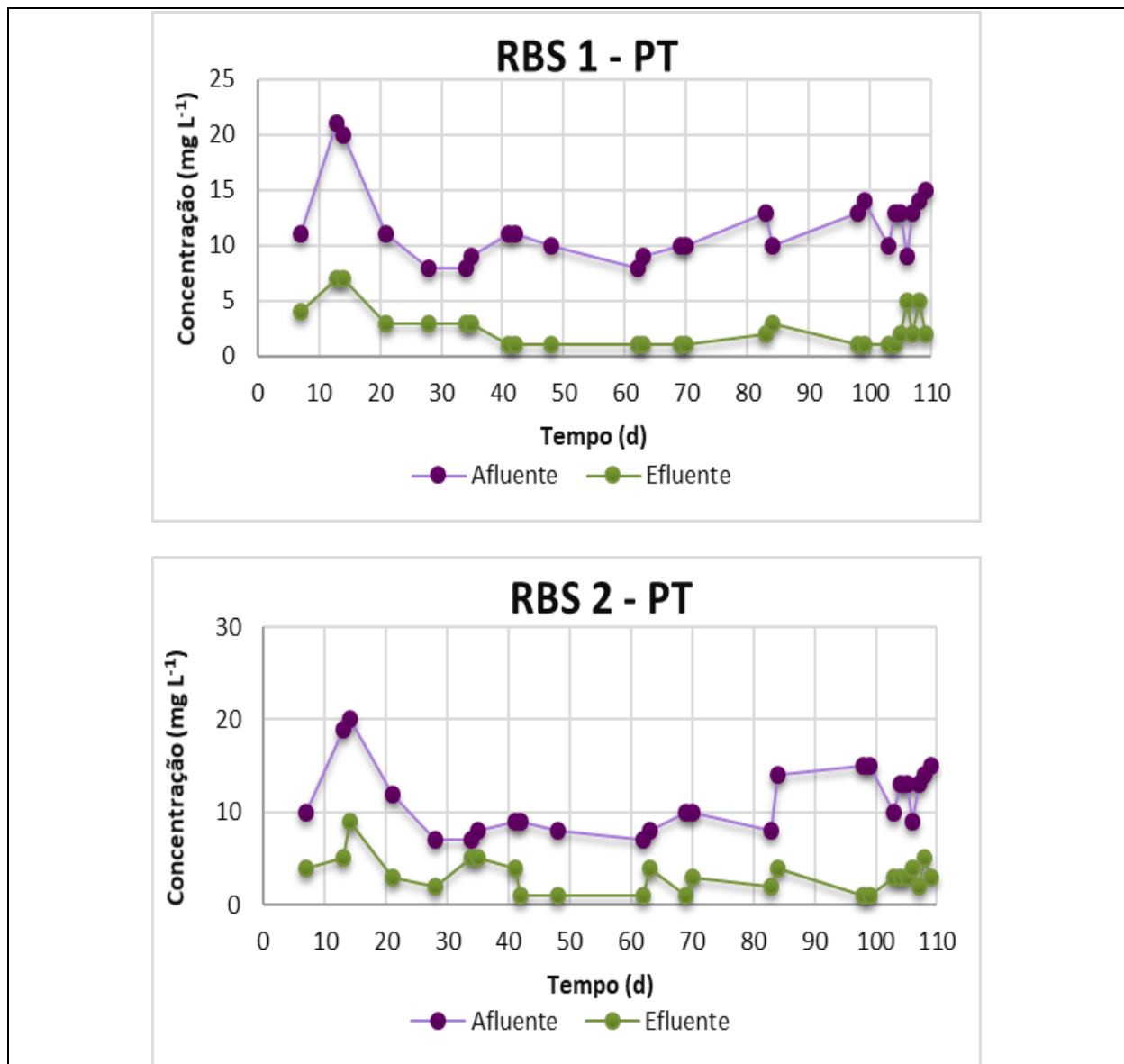
Valores de eficiência foram similares aos encontrados por Jiang et al. (2016) e Castellanos et al. (2021b). Jiang et al. (2016) operaram um RBS anaeróbia/anóxica/aeróbia e tiveram uma redução de matéria orgânica acima de 90%. Já Castellanos et al. (2021b) utilizaram um RBS com lodo granular de 1,5 L com as etapas aeróbias/anaeróbias (TRH de 4,7h e TRS de 15 dias) alcançaram uma eficiência de 93%. Paula (2017) em um RBS obteve uma redução máxima de 87% com etapas metabólicas anaeróbia/aeróbia/anóxica em um RBS de 6 litros com TRH de 6 h e TRS de 10 ou 30 dias. Portanto, os dois RBS tiveram eficiências de remoção de matéria orgânica de acordo com outros estudos com diferentes condições operacionais.

5.1.5 Remoção de Nutrientes

5.1.5.1 Fósforo

As concentrações médias de fósforo no esgoto tratado no RBS 1 e 2 foram de 2 e 3 mg L⁻¹, respectivamente. A Figura 14 mostra a variação dos valores de fósforo total no esgoto bruto e tratado ao longo do monitoramento do processo. A maior concentração de fósforo total medida no esgoto tratado foi de 7 mg L⁻¹ no RBS 1 e de 9 mg L⁻¹ no RBS 2 e a mínima foi de 1 mg L⁻¹ nos dois reatores. As maiores variações aconteceram no início do processo, depois estas oscilações na sua concentração foram mais reduzidas.

Figura 14. Concentrações de PT afluentes e efluentes nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo de todo o período de funcionamento do processo (n=25).



Nota: n = número de amostras.

Fonte: A Autora.

A eficiência de remoção de fósforo total chegou a uma média de 79% no RBS 1 e 71% no RBS 2 e em ambos as eficiências máximas chegaram a 93% (Tabela 8). Foi observado ainda que o RBS 1, que operou recebendo continuamente hormônio, teve uma eficiência um pouco maior que o RBS 2 (reator que não recebeu hormônios continuamente). Vale destacar que as menores eficiências observadas ocorreram no início do processo, provavelmente ainda em aclimação. Castellanos et al. (2021b) obtiveram uma remoção média de fosfato de 87%. Porém os autores relataram que a adição dos hormônios E2 e EE2 reduziu a sua eficiência devido ao impacto negativo na biomassa do reator.

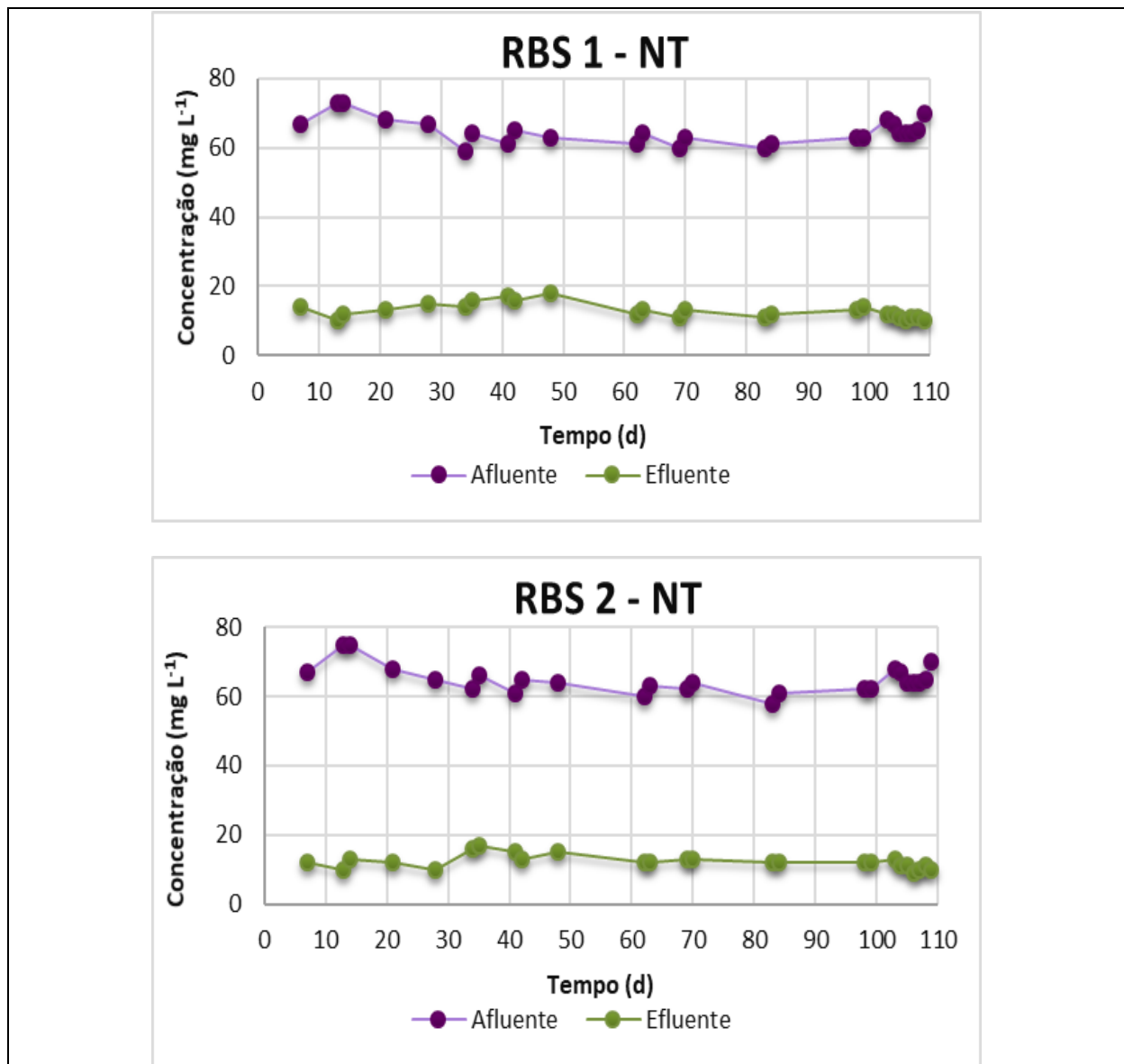
Embora seja observado certa similaridade entre as eficiências na remoção de PT, os reatores não foram iguais significativamente (valores de p podem ser vistos na Tabela 9). Neste caso, as medianas na remoção de PT foram 85 e 74% em RBS 1 e 2, respectivamente, logo justifica o resultado estatístico observado. Apesar disso, dentre as 25 amostragens realizadas ao longo do monitoramento, apenas 8 e 6 amostras tiveram eficiência respectivamente menor que 70% para RBS 1 e 2. Isto sugere que o processo não tenha sido afetado pelos hormônios como citado pela literatura.

Liu et al. (2020) utilizaram um RBS com etapas metabólicas similares a deste estudo, TRS variando de 12 a 25 dias e testes de variações de TRH. Os autores obtiveram uma remoção de PT máxima de 99,68% com TRH de 12h. Jiang et al. (2016) e Li et al. (2014) também operando RBS obtiveram remoções de PT acima de 90%, ambos os TRS eram abaixo de 10 dias. Van Haandel e Marais (1999) explicam que para se obter maiores remoções de PT se necessita de um baixo TRS (em torno de 3 e 5 dias). Um fator que possa explicar a menor eficiência de remoção de PT no presente trabalho (acima de 71%) em relação aos encontrados por Liu et al. (2020), Jiang et al. (2016) e Li et al. (2014) (acima de 90%) pode ter sido devido ao alto TRS adotado, que foi em média 61 dias no RBS 1 e 54 dias no RBS 2, apesar de Paula (2017) não ter observado diferenças na remoção de PT com duas distintas idades do lodo (10 e 30 dias). Vale ressaltar que mesmo não obtendo um percentual muito elevado de remoção, os valores de concentrações de PT no esgoto tratado foram baixos, ficando na faixa de 2 a 3 mg L⁻¹.

5.1.5.2 Nitrogênio

As concentrações médias de nitrogênio no esgoto tratado no RBS 1 foram de 13 mg L⁻¹ e no RBS 2 de 12 mg L⁻¹. A concentração máxima medida no RBS 1 e 2 foi de 18 e 17 mg L⁻¹ e a mínima de 10 e 9 mg L⁻¹, respectivamente. Na Figura 15 podemos observar a variação das concentrações de NT no esgoto bruto e tratado durante todo o funcionamento do processo.

Figura 15. Concentrações de NT afluentes e efluentes nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo de todo o período de funcionamento do processo (n=25).



Nota: n = número de amostras.

Fonte: A Autora.

Os reatores apresentaram um bom desempenho na remoção de NT com uma eficiência média de 80% no RBS 1 e de 81% e no RBS 2 (Tabela 8). A remoção chegou a valores máximos de 86% e 87% nos RBS 1 e 2, respectivamente. É possível observar que ambos tiveram comportamentos similares. No entanto, as eficiências dos reatores foram diferentes significativamente a partir do teste t-Student (Tabela 9) que foi o utilizado, pois os resultados de remoção de NT tiveram distribuição normal. Vale destacar que este teste é recomendado para a análise comparativo entre populações que possuem um n amostral maior que 30, o que

não foi o caso dos experimentos deste estudo ($n = 25$). Partindo-se do teste de Wilcoxon, o p valor obtido foi superior a 0,05, logo os reatores tiveram desempenhos semelhantes.

Para que se remova nitrogênio precisamos da fase aeróbia seguida da anóxica, fases essas que ficaram bem definidas nesse estudo, como podem ser observados nos valores encontrados de ORP e OD ao longo dos ciclos. O controle destes parâmetros pode ser um dos fatores que permitiram uma boa eficiência na remoção de nitrogênio. Castellanos et al. (2021b) relataram uma remoção de 71% de NT e atribuíram a baixa remoção a alta concentração de OD mantida dentro do reator (próximo aos níveis de saturação do oxigênio). Outro fator que pode ter contribuído para esse percentual de remoção pode ter sido devido ao TRH de 12 horas e TRS acima de 50 dias. O uso de maiores valores de TRS e TRH favorecem o desenvolvimento das bactérias nitrificantes que possuem baixa taxa de crescimento no lodo e permitem a ação das nitrificantes (AHN, 2006). Jiang et al. (2016) obtiveram eficiências de 82 a 92% com TRH de 12 e 16 h, enquanto, Liu et al. (2020) encontraram eficiências de 84% com TRH de 12 h. Estes autores tiveram eficiências altas (86 e 97%) adotando TRH menores que 12 h devido a adição de carbono orgânico na fase anóxica. Essa adição de carbono pode ter sido o fator que tenha influenciado na alta remoção de nitrogênio, uma vez que os organismos desnitrificantes são heterotróficos facultativos (WRAGE et al., 2001). Paula (2017) relatou que com um RBS utilizando um TRH de 6h houve uma eficiência média de remoção de na faixa entre 30 e 40%, reforçando que maiores eficiências ocorrem em maiores TRH.

5.2 AVALIAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS NOS RBS

5.2.1 Quantificação dos Hormônios no Esgoto Tratado e no Lodo Descartado

Para determinação dos hormônios foram testadas as metodologias de ELISA e HPLC-DAD. Nos testes de curva de calibração, efeito matriz e de recuperação no HPLC-DAD foi observado uma baixa sensibilidade para detecção e quantificação dos hormônios como mostra a Tabela 10. Assim foi descartada a possibilidade de utilização deste método para que se pudesse quantificar os hormônios no esgoto tratado. Em um estudo realizado por Araújo (2006) foi testado a eficiência de um cromatógrafo com detectores de DAD e de fluorescência para quantificação de hormônios em esgoto sintético. O detector DAD apresentou baixa sensibilidade comparado ao de fluorescência pois os valores de LQ para E2 e EE2 foram respectivamente de 231 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, os LQ com o detector de fluorescência tiveram valores de 14,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para E2 e 22,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para EE2. Paula (2017) e Souza (2019)

tiveram um LQ para EE2 de 50,7 e 30,3 ng L⁻¹, respectivamente, usando HPLC-FL e após a concentração da amostra em 1.000 vezes. Infelizmente não foi possível a utilização deste equipamento pois estava em manutenção. A partir desses resultados, optou-se por utilizar apenas a metodologia de ELISA para realização deste estudo.

Tabela 10. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de EE2 e E2 no esgoto tratado.

	LD (µg L ⁻¹)	LQ (µg L ⁻¹)
EE2	0,39	1,18
E2	0,48	1,47

Fonte: A Autora.

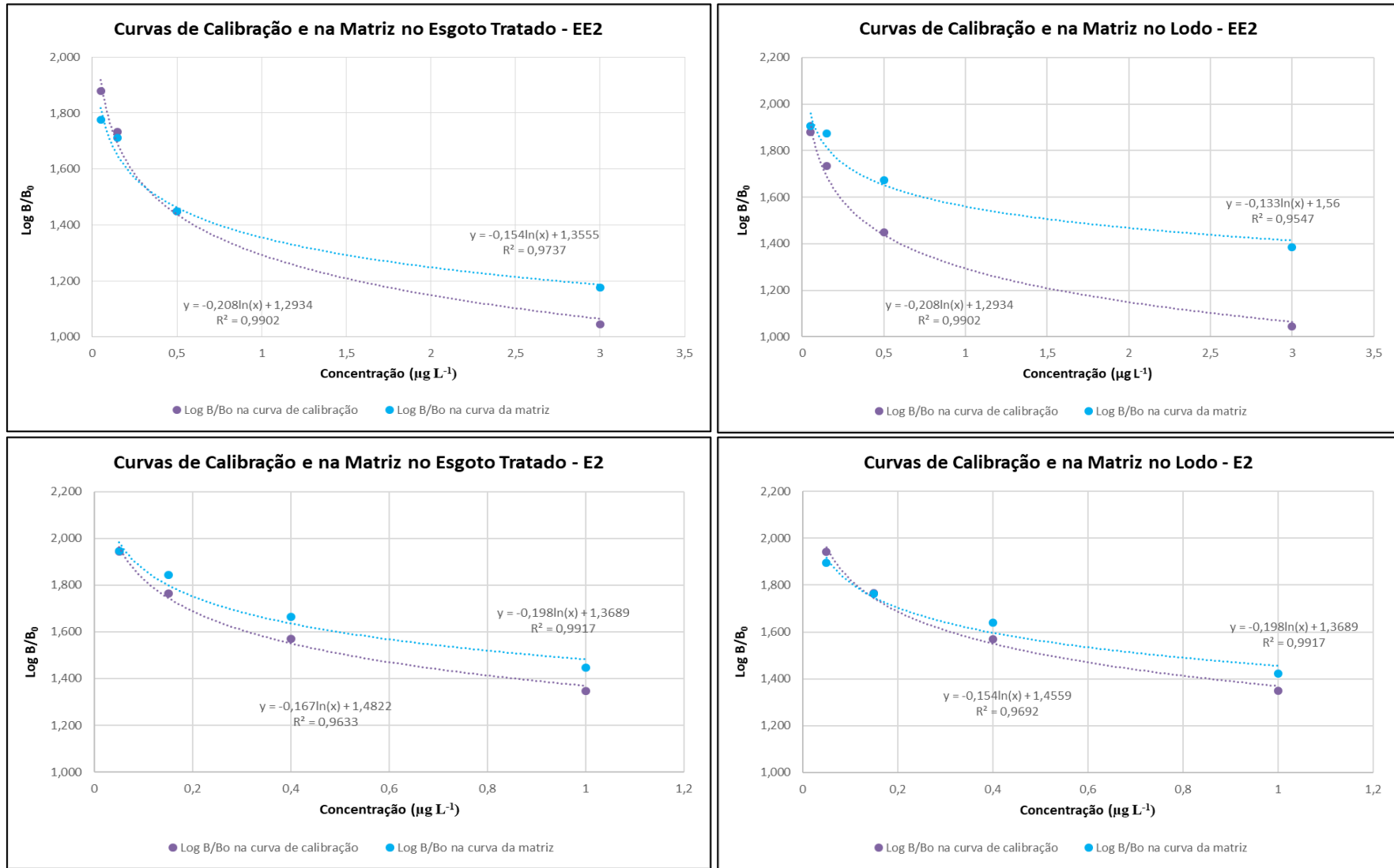
A curva de calibração realizada pelo ELISA com padrões nas concentrações de 0; 0,05; 0,15; 0,4 e 1 µg L⁻¹ para o E2 e 0; 0,05; 0,15; 0,5 e 3 µg L⁻¹ para o EE2 nas matrizes esgoto tratado e lodo está apresentada na Figura 16. Embora o fabricante recomende a construção de curvas em duplicata, foi realizada em triplicata para identificar a funcionalidade do kit para estas matrizes. A partir da revisão bibliográfica realizada, não foi encontrado algum estudo que utilizou este kit para identificação e quantificação de E2 e EE2 em lodo, mas Gomes et al. (2021) já utilizaram este tipo de kit para o monitoramento de EE2 em esgoto doméstico em Brasília.

Os gráficos da Figura 16 mostram comportamentos semelhantes entre as curvas de calibração e dos padrões na matriz do esgoto tratado, mas houve uma maior interferência na matriz do lodo. Além disso, pode-se observar que as curvas no E2 tiveram uma menor interferência da matriz, provavelmente devido a sua faixa de detecção e quantificação ser menor (entre 0,05 e 1 µg L⁻¹), ao contrário do EE2 que possui uma faixa maior (até 3 µg L⁻¹). Logo este método pode sofrer interferências quando as concentrações de hormônios forem maiores que 1 µg L⁻¹. Assim, optou-se por utilizar as curvas na matriz para a realização dos cálculos de concentração encontrados nas amostras dos RBS.

No teste de recuperação foi utilizada uma concentração nominal de 0,25 µg L⁻¹ para ambos os hormônios no esgoto tratado. A concentração média obtida de EE2 no esgoto tratado foi de 0,230 µg L⁻¹ com uma recuperação média de 92,1%. Para o hormônio E2, a concentração média obtida no esgoto tratado foi de 0,286 µg L⁻¹ com uma recuperação de 114,3%. Os valores para cálculo do percentual de recuperação estão descritos na Tabela 11.

Infelizmente não foi possível a realização de testes de recuperação no lodo devido à falta de kit de ELISA para tal finalidade. Assim, foram adotados os mesmos valores encontrados no esgoto tratado.

Figura 16. Curvas de calibração e na matriz do EE2 e E2 em amostras de esgoto tratado e do lodo.



Fonte: A Autora.

Tabela 11. Valores obtidos para cálculo do percentual de recuperação nas amostras de esgoto tratado.

	Concentração usada no esgoto tratado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
EE2	0,250 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,317	92,07
		0,240	
		0,133	
E2	0,250 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,361	114,33
		0,211	
		0,157	

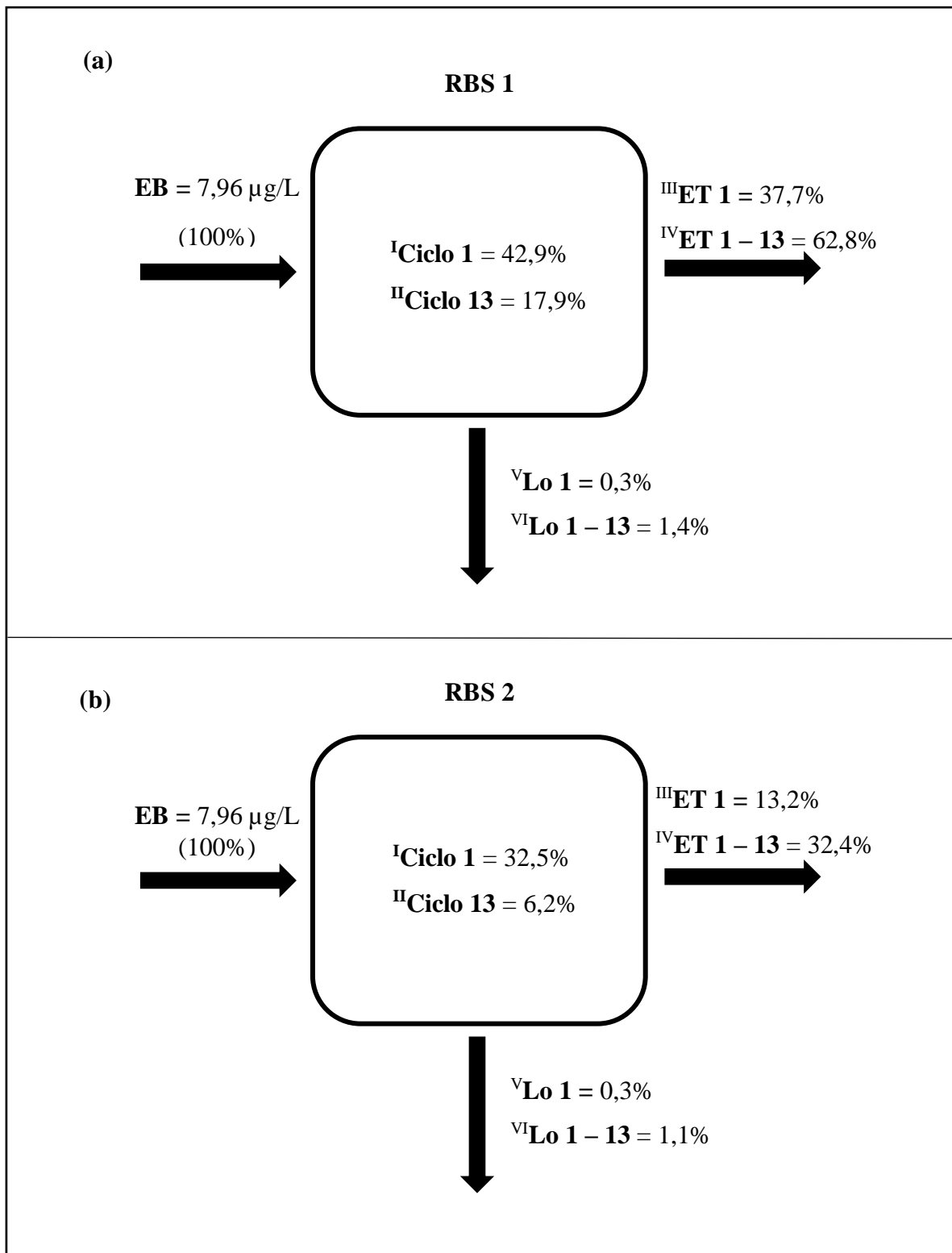
Fonte: A Autora.

5.2.2 Remoção do EE2 e E2

5.2.2.1 EE2

A concentração real de EE2 aplicada no esgoto bruto foi de $7,96 \mu\text{g L}^{-1}$, resultando em uma massa de $111,40 \mu\text{g}$. Este valor foi próximo ao nominal de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. No RBS 1, o percentual relativo que permaneceu no reator no primeiro ciclo foi de 42,9% e o no último ciclo foi de 17,9%. No esgoto tratado, o somatório dos percentuais relativos de massa foi de 62,8% e no lodo descartado de 1,4% totalizando 64,2% do EE2 que foi descartado nessas matrizes. No RBS 2, o percentual relativo que permaneceu no reator no primeiro ciclo foi de 32,5% e no último ciclo foi de 6,2%. No esgoto tratado o percentual foi de 32,4% e no lodo de 1,1%, totalizando 33,5%. Para ficar mais claro esses valores, a Figura 17 esquematiza os valores de concentração no esgoto bruto, o quanto permaneceu no reator e o quanto foi liberado tanto no esgoto tratado como no lodo.

Figura 17. Balanço percentual de massa de EE2 na entrada, saídas e permanência nos reatores RBS 1 (a) e RBS 2 (b).



Nota: I – Percentual que permaneceu no reator no primeiro ciclo; II – Percentual que permaneceu no reator no 13º ciclo; III - Percentual liberado com o esgoto tratado no primeiro ciclo; IV – Somatório do percentual liberado com o esgoto tratado no final dos 13 ciclos; V - Percentual liberado com o lodo descartado no primeiro ciclo e; VI - Somatório do percentual liberado com o lodo descartado no final dos 13 ciclos.

Fonte: A Autora.

A Tabela 12 mostra os valores de concentração, massa e de percentual de massa em cada ciclo. O RBS 1 teve uma concentração e consequente percentual de massa maior do que no RBS 2 e isso se deve ao RBS 1 ter recebido hormônio desde o início do processo, mostrando que a aclimatação não resultou em uma boa eficiência de remoção, mas apenas acumulou mais EE2 no reator. Podemos observar também que as concentrações presentes no lodo foram maiores do que as encontradas no esgoto tratado. O percentual de massas foi menor visto que o volume de lodo descartado sempre foi menor do que o de esgoto. Este resultado sugere que o EE2 permaneceu no reator podendo ser constantemente liberado durante o descarte de lodo e/ou esgoto tratado como já foi observado por Souza (2019).

Tabela 12. Valores de concentração, massa e percentual de massa liberados a cada ciclo no esgoto tratado e no lodo de EE2.

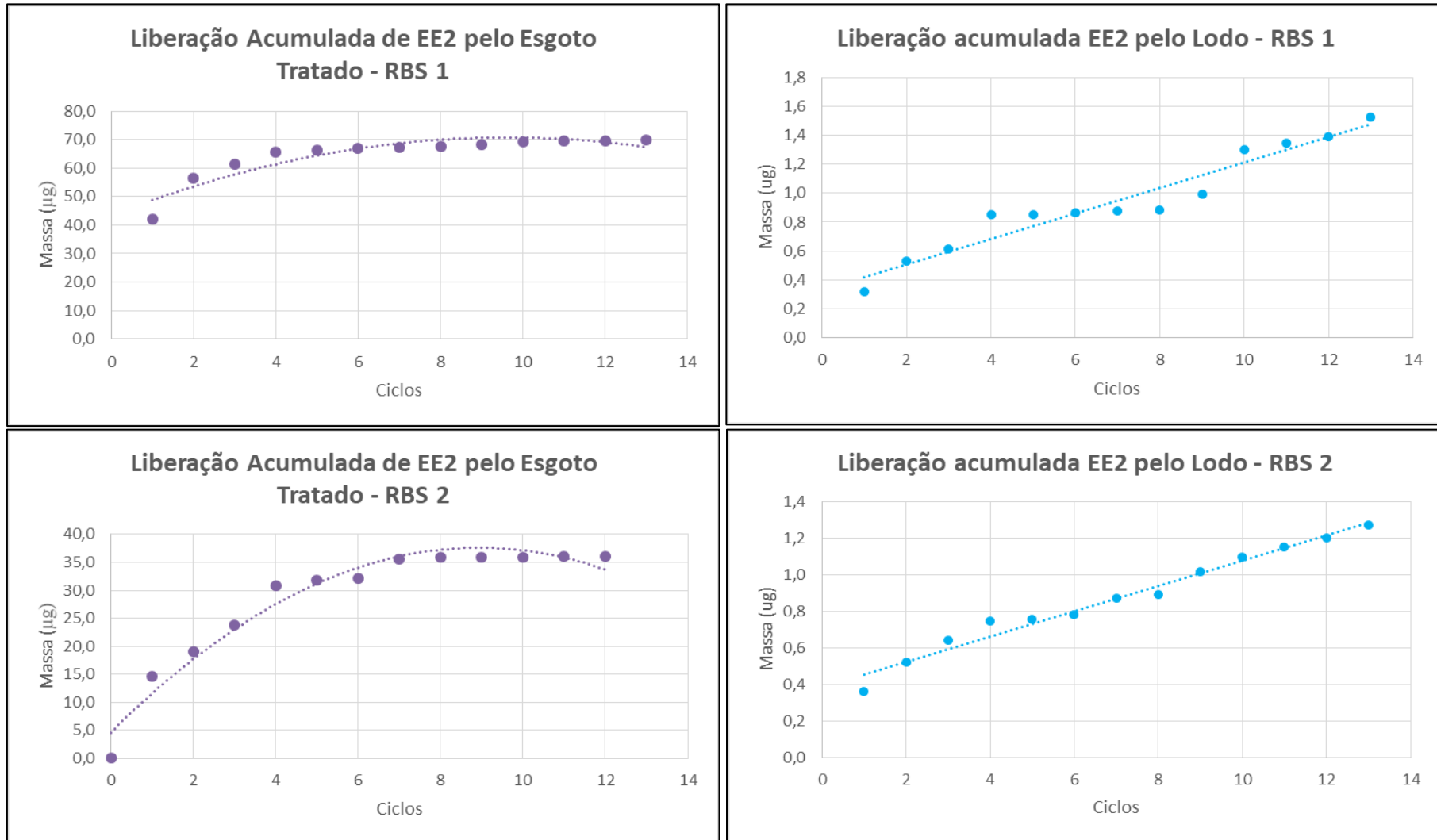
Ciclos	Esgoto Tratado						Lodo					
	RBS 1			RBS 2			RBS 1			RBS 2		
	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	M (μg)	PM	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	M (μg)	PM	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	M (μg)	PM	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	M (μg)	PM
14/02 - N	3,001	42,02	37,71	1,050	14,70	13,20	8,009	0,320	0,288	6,065	0,364	0,327
15/02 - D	1,037	14,51	13,03	0,308	4,310	3,869	5,185	0,207	0,186	2,607	0,156	0,140
15/02 - N	0,338	4,734	4,249	0,337	4,720	4,237	1,723	0,086	0,077	1,992	0,120	0,107
16/02 - D	0,304	4,262	3,826	0,501	7,013	6,296	5,862	0,234	0,210	1,764	0,106	0,095
16/02 - N	0,045	0,631	0,566	0,076	1,059	0,951	0,105	0,004	0,004	0,161	0,010	0,009
17/02 - D	0,046	0,638	0,573	0,019	0,272	0,244	0,353	0,014	0,013	0,428	0,026	0,023
17/02 - N	0,030	0,420	0,377	0,250	3,502	3,144	0,181	0,007	0,007	1,463	0,088	0,079
18/02 - D	0,022	0,311	0,279	0,018	0,253	0,228	0,276	0,008	0,007	0,362	0,022	0,019
18/02 - N	0,040	0,562	0,504	0,002	0,030	0,027	2,173	0,109	0,098	2,065	0,124	0,111
19/02 - D	0,084	1,170	1,050	0,007	0,093	0,084	7,674	0,307	0,276	1,399	0,084	0,075
19/02 - N	0,015	0,210	0,189	0,003	0,048	0,043	1,522	0,046	0,041	0,838	0,050	0,045
20/02 - D	0,016	0,226	0,203	0,004	0,059	0,053	1,611	0,048	0,043	0,889	0,054	0,048
20/02 - N	0,021	0,292	0,262	0,003	0,036	0,033	3,342	0,134	0,120	1,167	0,070	0,063
Total	4,999	69,99	62,82	2,579	36,10	32,40	38,02	1,526	1,369	21,21	1,273	1,142

Notas: C = concentração; M = Massa; PM = percentual de massas; D = dia; N = noite. *os valores de concentração foram corrigidos pelo fator de diluição e/ou concentração, sendo todas as amostras ficando dentro da faixa de quantificação mínima e máxima.

Fonte: A Autora.

Na Figura 18 pode ser observada a distribuição de massa do EE2 acumulada no esgoto tratado e no lodo descartado ao longo dos 13 ciclos. Como já mencionado na Tabela 12, a massa presente no RBS 1 foi maior do que no RBS 2, devido a aclimatação que o primeiro reator recebeu com os hormônios. A partir do quarto ciclo, os valores de massa acumulada tenderam a se manter estáveis e depois a decair, indicando que o EE2 não estava mais sendo liberado pelo esgoto tratado. No lodo foi observado o fenômeno inverso, onde os valores de massa acumulada tenderam a aumentar a cada ciclo, com um crescimento constante. Logo, entende-se que tanto no RBS 1 quanto no RBS 2 o EE2 no esgoto tratado teve uma tendência de decaimento ao longo dos ciclos e no lodo a tendência foi de aumento, indicando que possivelmente o principal mecanismo de remoção de EE2 que ocorreu foi o de sorção pelo lodo.

Figura 18. Liberação acumulada de EE2 pelo esgoto tratado e pelo lodo nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo dos ciclos (n=13).



Fonte: A Autora.

Castellanos et al. (2021a) em seu estudo relatou que o EE2 apresentou maior resistência a biodegradação e que isso poderia estar relacionado ao fato desse hormônio ser um estrogênio sintético que apresenta um grupo em sua estrutura, localizado na posição 17, que pode potencialmente bloquear o acesso ao grupo hidroxila que fica localizado nessa mesma posição, tornando sua degradação mais difícil. Além disso, ele relatou que ao considerar a biomassa presente no reator e a massa de hormônio que foi alimentada, apenas 0,04% foram removidos por adsorção. Eles sugerem que, ao longo do ciclo do RBS, ocorre uma rápida adsorção inicial na biomassa granular na etapa anaeróbica, seguida por biodegradação sob condições de aeração. Esses resultados divergem um pouco do encontrado nesse estudo, onde maiores concentrações foram encontradas no lodo e a tendência era que o EE2 se encontrava em maioria sorvida no lodo. Dubey et al. (2022) estudou a remoção em duas estações de grandes escalas, uma ETE Biodenifro e outra A2O. Foi relatado que na ETE A2O o digestor anaeróbico não estava funcionando e as amostras coletadas foram de lodo desidratado não tratado. Ele não encontrou EE2 no lodo de nenhuma das ETES e mencionou que remoção de EE2 aumentou com o aumento do OD e que isso pode ser devido à alta taxa de biodegradação (anaeróbico<anóxico<aeróbico), sendo assim a principal via de remoção foi a biodegradação. Paula (2017) em seu processo RBS relatou que a principal via de remoção do EE2 seria a sorção com subsequente dessorção. Zheng et al. (2021) e Souza (2019) ambos operando um RBS, sugeriram que a principal via de remoção foi por sorção no lodo. Zheng et al. (2021) relata ainda que o EE2 é um hormônio muito biorrefratário.

A remoção média de EE2 no RBS 1 foi de 35,8% e no RBS 2 de 66,5%. Dubey et al. (2022) em seu processo relatou uma eficiência acima de 90% e Castellanos et al. (2021a) operando um RBS também encontraram alta remoção (~ 93%). Zheng et al. (2021) operando um RBS de TRH de 4h conseguiu 84,8% de remoção, mas Fang et al. (2019) analisando 6 diferentes ETES, todas de lodo ativado (valos de oxidação, RBS, alimentação em 1 etapa, alimentação em 2 etapas, alimentação em 3 etapas e aeração estendida) obtiveram apenas 28,3% de remoção de EE2 no processo por RBS e a maior eficiência foi de 99,3% na estação com alimentação em 3 etapas. Ele atribui a baixa remoção no RBS ao TRH curto e a sua alta vazão média diária. Eles sugeriram que para uma boa eficiência de EE2 se necessita de TRH elevado. Essa colocação se opõe as eficiências relatadas por Castellanos et al. (2021a) e Zheng et al. (2021) que com TRH baixo conseguiram alta remoção. No presente estudo que utilizou um TRH de 12h não foram atingidos altos valores de remoção de EE2, principalmente no RBS 1 que estava sendo alimentado com o hormônio desde o início do processo.

Estudos sugerem ainda uma possível relação entre a nitrificação durante a remoção de NT e a biodegradação do EE2 (JOSS et al., 2003; CLARA et al., 2005; SUÁREZ et al., 2010; HAMID AND ESKICIOGLU, 2012). Li et al. (2020) sugeriram a biodegradação de hormônios estrogênicos pelas bactérias oxidadoras de amônia (AOB) pela ação da enzima amônio monooxigenase que é capaz de promover a co-metabolização de EE2 e amônia. Khunjar et al. (2011) observaram o papel importante na biodegradação conjunta de EE2 pelas bactérias heterotróficas aeróbias e às AOB. No entanto, Kassotaki et al. (2019) que cultivaram culturas puras de AOB e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) em RBS, não obtiveram valores significativos de remoção/biodegradação de EE2 mesmo em altas taxas de remoção de NT. Os RBS do presente estudo tiveram valores expressivos de remoção NT, mas isto não refletiu em biodegradação do EE2. Pelo que parece, o principal mecanismo provável para a remoção de EE2 encontrada foi pela sorção pelo lodo descartado.

Poucos estudos abordaram a remoção simultânea de PT e de EE2. Chein et al. (2018) observaram baixa taxa de degradação de EE2 em processos com alta remoção de PT. No entanto, Torresi et al. (2019) e Kent e Tay (2019) sugeriram a remoção de alguns estrogênios em sistemas com remoção de PT, primeiramente por sorção e depois por biodegradação. Os sistemas RBS deste presente estudo mostraram sorção pelo lodo como via principal de remoção mesmo em um sistema que ficou por um longo período de aclimação (RBS 1). Provavelmente se o monitoramento fosse mais prolongado, concentrações de EE2 ainda seriam medidas no lodo descartado. Souza (2019) operando um RBS com as mesmas etapas metabólicas utilizando um TRH de 8h e uma TRS de 50 dias encontrou 16,5% de remoção de EE2 e também indicou que os resíduos de hormônios ficaram sorvidos no lodo do processo. Uma possível justificativa para este fenômeno é a sequência metabólica escolhida nos sistemas. A fase anaeróbia inicial foi importante para o desenvolvimento dos organismos acumuladores de fósforo (OAF), mas a provável redução da matéria orgânica nesta etapa pode ter provocado uma inibição das bactérias heterotróficas na etapa aeróbia seguinte. A inibição das heterotróficas prejudicou o que segundo os autores auxiliam na biodegradação de EE2 junto às AOB. Por outro lado, como as bactérias nitrificantes são aeróbias autotróficas, esta inibição favoreceu o seu crescimento uma vez que é comum a competição desses organismos pela aeração (VON SPERLING, 2012). Uma possível solução seria a adição de matéria orgânica na etapa aeróbia promovendo a co-metabolização da amônia e do EE2, mas isto pode vir a reduzir a taxa de nitrificação. Outro fator que poderia ter favorecido uma maior remoção de EE2 seria a redução do TRS aumentando o volume de lodo a ser descartado do processo, mas isso poderia também reduzir a remoção de NT devido à baixa taxa de crescimento das nitrificantes, o que exigem um alto TRS no sistema. Gomes et al. (2021)

apontaram sobre a escassez de estudos correlacionando a remoção de PT e de EE2, mesmo em sistemas com remoção de fósforo por coagulação química. Portanto, a maior porção do EE2 ficou sorvida no lodo, por isso o seu baixo percentual de remoção.

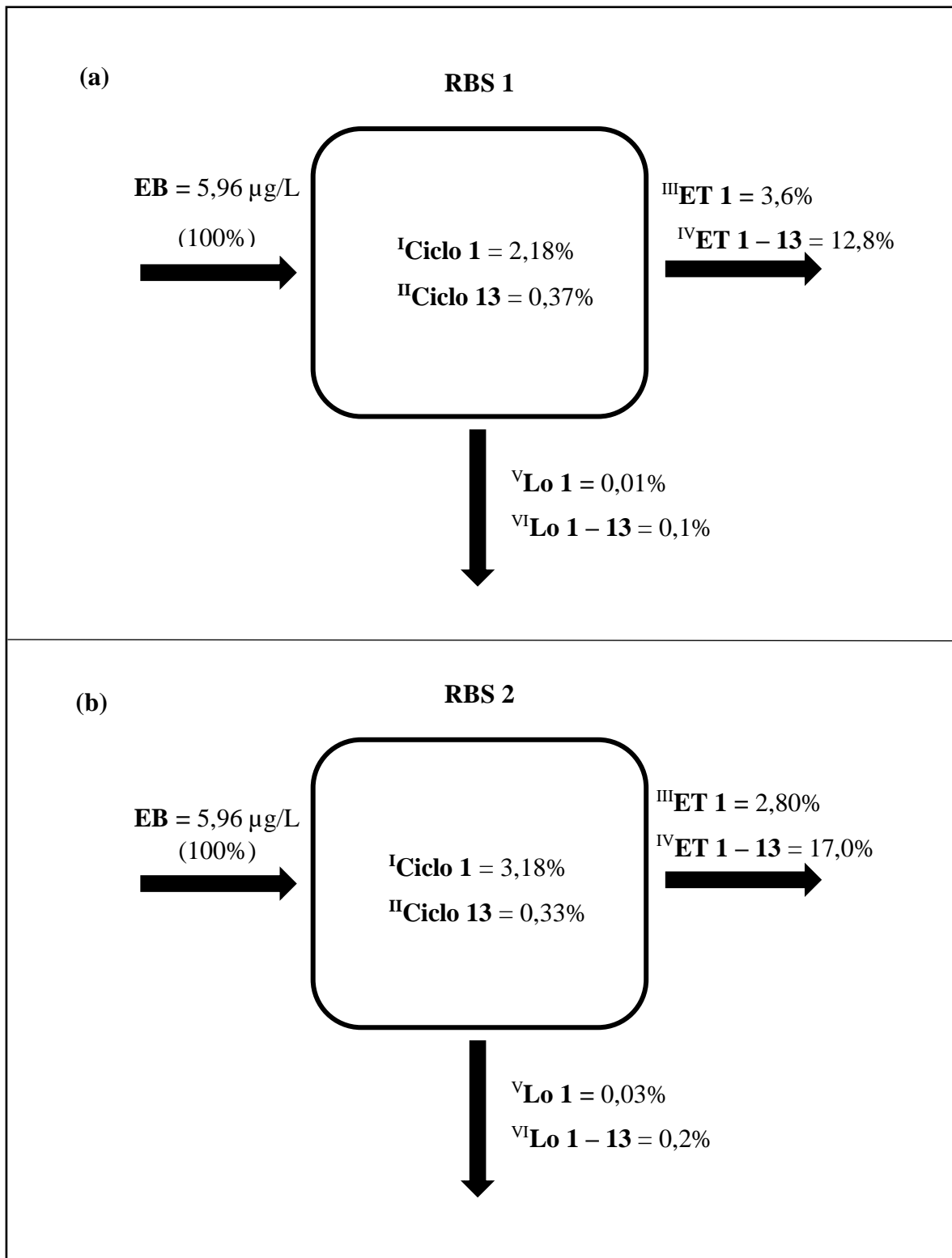
5.2.2.2 E2

A concentração real de E2 no esgoto bruto foi de $5,96 \mu\text{g L}^{-1}$, bem próxima à concentração nominal ($5 \mu\text{g L}^{-1}$), correspondendo a uma massa adicionada ao sistema de $83,39 \mu\text{g}$. No RBS 1, o percentual relativo que permaneceu no reator no primeiro ciclo foi de 2,2% e no último ciclo foi de 0,4%. No esgoto tratado, o somatório total do percentual relativo de massa foi de 12,8% e no lodo descartado foi de 0,1%, totalizando 12,9% do E2 que saiu do sistema. No RBS 2, o percentual relativo que permaneceu no reator no primeiro ciclo foi de 3,2% e no último ciclo foi de 0,3%. No esgoto tratado, o somatório total do percentual relativo de massa foi de 17,0% e no lodo descartado foi de 0,2%, totalizando 17,2%. Para melhor ilustrar, a Figura 19 esquematiza os valores de concentração no esgoto bruto, o quanto permaneceu no reator e o quanto foi liberado tanto no esgoto tratado como no lodo.

Na Tabela 13 podemos observar os valores de concentração, massa e de percentual em massa do E2 ao longo de cada ciclo. Assim como ocorreu com EE2, a concentração também foi maior no RBS 1 do que no RBS 2, porém essa diferença não foi tão grande se comparado ao EE2. A concentração no lodo também foi maior do que a encontrada no esgoto tratado.

Na Figura 20 podemos observar o percentual liberado em massa acumulada do E2 no esgoto tratado e no lodo descartado. Podemos observar que a liberação foi um pouco maior no RBS 2 do que no RBS 1. Diferentemente do que ocorreu no sistema com EE2, o E2 tem uma tendência de decaimento tanto no esgoto tratado como no lodo descartado, pois nos últimos ciclos quase não se detectou mais E2 em nenhuma das duas matrizes. Isso pode sugerir uma provável biodegradação desse hormônio por este processo. A maioria dos trabalhos são consensuais de que a principal via de remoção de E2 é por meio da biodegradação (SOUZA, 2019; CASTELLANOS et al., 2021a; ZHENG et al., 2021; DUBEY et al., 2022), o que corrobora com os achados deste presente estudo.

Figura 19. Balanço percentual de massa de E2 na entrada, saídas e permanência nos reatores RBS 1 (a) e RBS 2 (b).



Nota: I – Percentual que permaneceu no reator no primeiro ciclo; II – Percentual que permaneceu no reator no 13º ciclo; III - Percentual liberado no esgoto tratado no primeiro ciclo; IV – Somatório do percentual liberado no esgoto tratado no final dos 13 ciclos; V - Percentual liberado no lodo no primeiro ciclo e; VI - Somatório do percentual liberado no lodo no final dos 13 ciclos.

Fonte: A Autora.

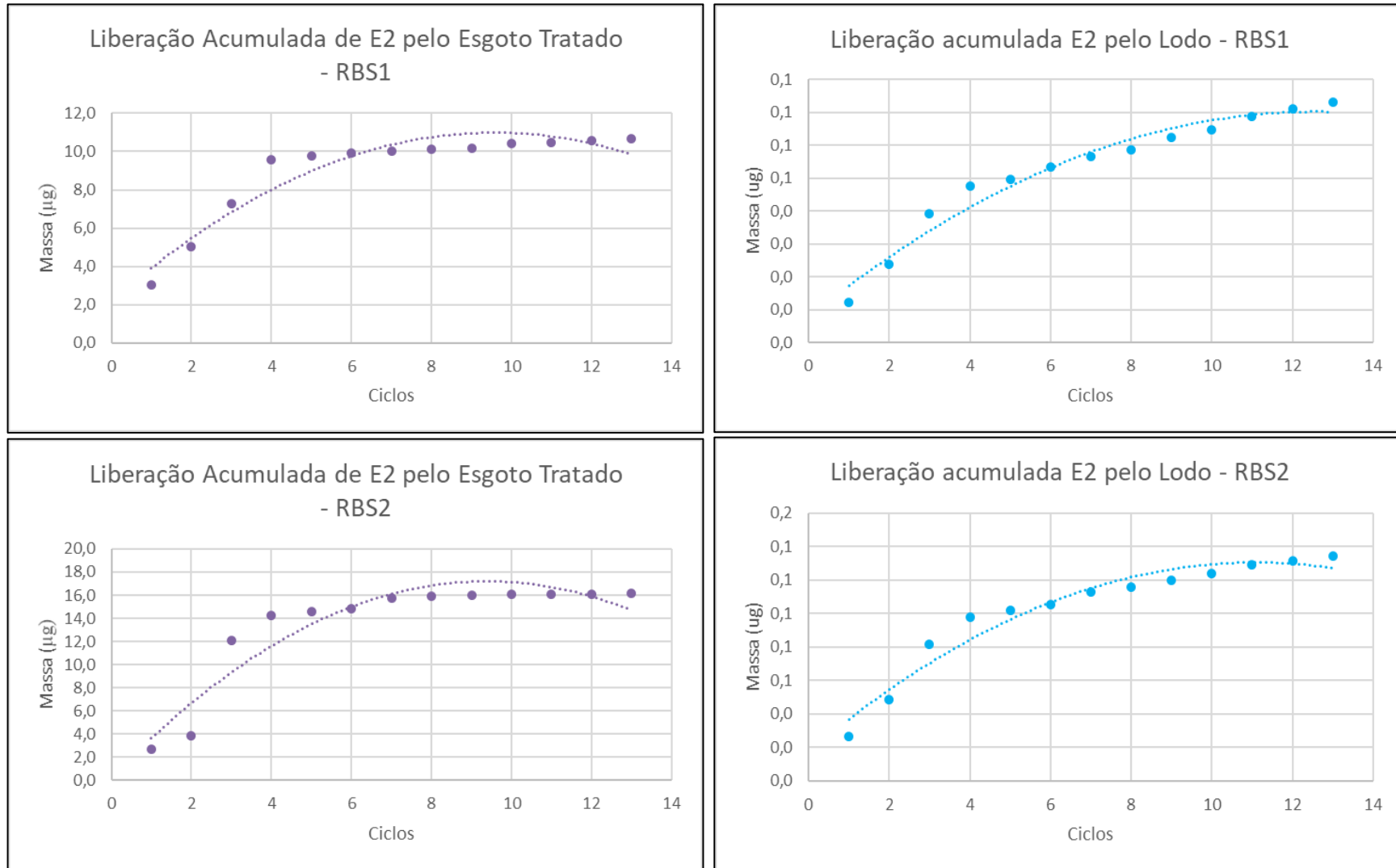
Tabela 13. Valores de concentração, massa e percentual de massa liberados a cada ciclo no esgoto tratado e no lodo de E2.

Ciclos	Esgoto Tratado						Lodo					
	RBS 1			RBS 2			RBS 1			RBS 2		
	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)	M (μg)	PM	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)	M (μg)	PM	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)	M (μg)	PM	C ($\mu\text{g L}^{-1}$)	M (μg)	PM
14/02 - N	0,215	3,015	3,616	0,167	2,333	2,798	0,306	0,012	0,015	0,445	0,027	0,032
15/02 - D	0,144	2,019	2,421	0,077	1,071	1,284	0,291	0,012	0,014	0,369	0,022	0,027
15/02 - N	0,162	2,261	2,712	0,514	7,200	8,634	0,307	0,015	0,018	0,550	0,033	0,040
16/02 - D	0,162	2,261	2,712	0,133	1,869	2,241	0,211	0,008	0,010	0,266	0,016	0,019
16/02 - N	0,016	0,231	0,277	0,024	0,343	0,411	0,050	0,002	0,002	0,069	0,004	0,005
17/02 - D	0,010	0,142	0,170	0,012	0,169	0,203	0,092	0,004	0,004	0,057	0,003	0,004
17/02 - N	0,005	0,077	0,092	0,058	0,819	0,982	0,083	0,003	0,004	0,124	0,007	0,009
18/02 - D	0,018	0,113	0,136	0,010	0,145	0,174	0,066	0,002	0,002	0,055	0,003	0,004
18/02 - N	0,005	0,076	0,091	0,005	0,072	0,087	0,078	0,004	0,005	0,060	0,004	0,004
19/02 - D	0,017	0,242	0,291	0,004	0,050	0,060	0,053	0,002	0,003	0,068	0,004	0,005
19/02 - N	0,004	0,054	0,065	0,002	0,031	0,038	0,138	0,004	0,005	0,089	0,005	0,006
20/02 - D	0,004	0,057	0,069	0,002	0,034	0,040	0,081	0,002	0,003	0,037	0,002	0,003
20/02 - N	0,008	0,113	0,135	0,003	0,043	0,051	0,051	0,002	0,002	0,046	0,003	0,003
Total	0,762	10,66	12,78	1,013	14,18	17,00	1,805	0,073	0,088	2,235	0,134	0,161

Notas: C = concentração; M = massa; PM = percentual de massas; D = dia; N = noite. *os valores de concentração foram corrigidos pelo fator de diluição e/ou concentração, sendo todas as amostras ficando dentro da faixa de quantificação mínima e máxima.

Fonte: A Autora.

Figura 20. Liberação acumulada de E2 pelo esgoto tratado e pelo lodo nos reatores RBS 1 e RBS 2 ao longo dos ciclos (n=13).



Fonte: A Autora.

Após os 13 ciclos, a remoção de E2 no RBS 1 foi de 87,1% e no RBS 2 foi de 82,8%. Zheng et al. (2021) relataram que a remoção de E2 depende principalmente da biodegradação, e eles conseguiram uma remoção de 93,5% em um RBS. Castellanos et al. (2021a) obtiveram 99% de remoção de E2 em um sistema anaeróbio seguido por um lodo granular aeróbio. Dubey et al. (2022) relataram que o E2 teve maior remoção na condição anaeróbia, enquanto que o EE2 sua remoção foi na condição aeróbia. Souza (2019) que trabalhou com um RBS com as mesmas fases deste estudo, encontrou um resultado semelhante ao deste estudo, indicando 86,2% de remoção provavelmente por biodegradação. Já Fang et al. (2019) nos 6 tipos de tratamento de esgotos diferentes já mencionados acima, conseguiu baixa remoção em todos os processos, com valores que variaram entre 6,4% a 63%. Em seu processo de alimentação por 3 etapas eles conseguiram uma remoção de até 99% de EE2, enquanto que para o E2 foi apenas de 6,4%. Estes autores justificaram estas eficiências em função da maior hidrofobicidade do EE2. Além disso, eles atribuíram aos baixos valores de remoção de E2 as características operacionais do processo como o baixo tempo de retenção hidráulica, mas que o baixo valor de TRS favoreceu a remoção de EE2 pelo lodo.

6. CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a remoção de nutrientes, matéria orgânica e dos hormônios estrogênicos 17 α -etinilestradiol (EE2) e 17 β -estradiol (E2) por reatores em batelada sequenciais (RBS) adotando as fases anaeróbia, aeróbia e anóxica com um TRH de 12 horas, sendo um reator aclimatado com os hormônios (RBS 1) e outro sem esta aclimação (RBS 2). A partir disso foi possível chegar as seguintes conclusões.

Os dois reatores mostraram uma alta eficiência nas remoções de matéria orgânica (DQO e COD) e nutrientes (NT e PT), mesmo apresentando diferença significativa na maioria dos parâmetros analisados entre os reatores, ambos tiveram comportamentos semelhantes.

Apesar de estudos apontarem que os hormônios estrogênicos prejudicam a eficiência dos processos RBS por afetarem a sua biomassa, o presente estudo encontrou um bom desempenho nestes sistemas, mesmo no RBS 1 que foi aclimatado por um longo período com os hormônios.

O teste ELISA foi eficiente na determinação dos hormônios E2 e EE2 em esgoto tratado e em lodo. A determinação por este método requereu pouca quantidade de amostra o que se mostrou bem aplicável em sistemas de escala de bancada, visto que geralmente estudos desse tipo não possuem um volume alto para coleta de amostras.

Não foi observada uma diferença na taxa de remoção e no mecanismo de remoção dos hormônios entre o reator aclimatado (RBS 1) e o não aclimatado (RBS 2). O provável mecanismo de remoção de EE2 foi pela sorção no lodo e não por biodegradação, mesmo nos reatores com alta taxa de remoção de NT e PT, contrariando os achados na literatura. Sendo assim, estes micropoluentes podem ser constantemente descartados pelo lodo em excesso desses processos. Por outro lado, o E2 mostrou uma tendência de biodegradação, convergindo com os dados citados pela literatura.

7. CONSIDERAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando os contratempos e ajustes de tempo necessários para o término deste trabalho devido principalmente à pandemia de SARS-Cov-19 instaurada em março de 2020 e que permaneceu até o meado de 2021, algumas atividades inicialmente previstas não puderam ser realizadas.

Os ensaios com reatores em maior escala (piloto) estavam previstos, mas não puderam ser realizados. Esta abordagem seria importante para avaliar a remoção de nutrientes e de estrogênios com o uso de esgoto sanitário ao invés do sintético. Além disso, seria possível o descarte de maiores volumes de lodo o que poderia ajudar na análise de resíduos uma vez que seria possível a concentração desses resíduos nessas matrizes.

Apesar do robusto resultado de resíduos de hormônios no esgoto tratado realizado pelo ELISA, não foi possível a realização dos testes de recuperação em lodo descartado. Visto a complexidade desta matriz, seria importante a realização de testes de extração e ajustes no efeito matriz, bem como a análise complementar pela cromatografia líquida com detector de fluorescência.

Como visto nos resultados deste trabalho, o EE2 teve tendência de aumento para sua liberação no lodo ao longo dos ciclos, sendo o seu principal mecanismo de remoção a sorção no lodo. Sendo assim, seria interessante aumentar o tempo de monitoramento (amostragem acima de 13 ciclos) dos resíduos no lodo descartado.

Por fim, como este estudo apontou que a sorção pelo lodo é a principal via de remoção do EE2, seria interessante abordar formas de tratamento deste lodo antes do seu descarte. Como a revisão bibliográfica sinalizou, a digestão aeróbia do lodo pode ser uma das alternativas para ser avaliado. No caso de E2, seria importante avaliar os metabólitos gerados pelo processo e avaliar se a sua atividade estrogênica foi reprimida pelo processo.

REFERÊNCIAS

- ADEEL, M.; SONG, X.; WANG, Y.; FRANCIS, D.; YANG, Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**. v. 99:107-119, 2017.
- AHN, Y-H (2006) Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. **Process Biochem**. v. 41:1709-1721, 2006.
- ALLEN, Y.; MATTHIESSEN, P.; SCOTT, AP.; HAWORTH, S.; FEIST, S.; THAIN, JE. The extent of oestrogenic contamination in the UK esturine and marine environments--further surveys of flounder. **Science Total Environmental**. v. 15;233(1-3):5-20, 1999.
- ANKLEY, G.; FEIFAREK, D.; BLACKWELL, B.; CAVALLIN, J.; JENSEN, K.; KAHL, M.; POOLE, S.; RANDOLPH, E.; SAARI, T.; VILLENEUVE, D. Re - evaluating the significance of estrone as an environmental estrogen. **Environmental Science & Technology**. v. 51, p. 4705-4713, 2017.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th ed. Washington, DC, 2017.
- 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.
- ARAÚJO, J. **Estudo da Eficiência do Tratamento de Efluentes Domésticos da Cidade de Araraquara-SP na Remoção de Hormônios Sexuais**. Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.
- ATKINSON, S. K.; MARLATT, V. L.; KIMPE, L. E.; LEAN, D. R.; TRUDEAU, V. L.; BLAIS, J. M. The occurrence of steroidal estrogens in southeastern Ontario wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 430, p. 119–125, 2012.
- BERNARDELLI, J. **Biodegradação de estrona, 17B-estradiol e 17A-etinilestradiol em sistemas aeróbios de tratamento**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- BILA, D. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β-estradiol pelo processo de ozonização**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- BILA D.; DEZOTTI M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências**. Química Nova. v. 3: 651-666, 2007.
- BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS – ANA. **Atlas esgoto – Despoluição de Bacias Hidrográficas**. Brasília, 2017.

BRASIL, Resolução CONAMA 430, de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes**, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

BRASIL. Lei nº. 11.445, de 5 de janeiro de 2007. **Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico**. Brasília, 2007.

BRASIL. Decreto nº. 8211, de 21 de março de 2014. Altera o Decreto nº. 7217, de 21 de junho de 2010, que regulamenta a Lei 11.445, de 5 de janeiro de 2007, que **estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico**. Brasília, 2014.

BYRNS, G. The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. **Water Research**, 35 (10), 2523-2533, 2001.

CASTELLANOS, R.M.; BASSIN, J.P.; BILA, D.M.; DEZZOTI, M. Biodegradation of natural and synthetic endocrine-disrupting chemicals by aerobic granular sludge reactor: Evaluating estrogenic activity and estrogens fate. **Environmental Pollution**, v. 274(2021)116551, 2021a.

CASTELLANOS, R.M.; DEZZOTI, M.; BASSIN, J.P. COD, nitrogen, and phosphorus removal from simulated sewage in an aerobic granular sludge in the absence and presence of natural and synthetic estrogens: Performance and biomass physical properties assessment. **Biochemical Engineering Journal**, 176(2021)108221, 2021b.

CHEN, P.; TORIBARA, T.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**. v. 28, p. 1756 – 1758, 1956.

CHEN, Q.; LI, Z.; HUA, X. Fate of estrogens in a pilot-scale step-feed anoxic/oxic wastewater treatment system controlling by nitrogen and phosphorus removal. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25(2018)12981-12991, 2018.

CHIMCHIRIAN, R. F.; SURI, R. P. S.; FU, H. Free Synthetic and Natural Estrogen Hormones in Influent and Effluent of Three Municipal Wastewater Treatment Plants. **Water Environment Research**, v. 79, n. 9, p. 969-74, 2007.

CLARA, M.; KREUZINGER, N.; STREANN, B.; GANS, O.; KROISS, H. The solid retention time - a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. **Water Research**. v.39:97-106, 2005.

CUNHA, D., L.; SILVA, S., M., C, DA; BILA, D., M.; OLIVEIRA, J., L., M.; SARCINELLI, P. N.; LARENTIS, A. L. Regulamentação do estrogênio sintético 17 α etinilestradiol em matrizes aquática na Europa, Estados Unidos e Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 3, p. 1-3. 2016.

CUNHA, D.; PAULA, L.; SILVA, S.; BILA, D.; FONSECA, E.; OLIVEIRA, J. Ocorrência e remoção de estrogênios por processos de tratamento biológico de esgotos. **Ambiente & Água**, v. 12 n. 2, 2017.

De MES, T.; ZEEMAN, G. Occurrence and fate of estrone 17 β -estradiol and 17 α -etinilestradiol in STPs for domestic wastewater. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. v. 4, p. 275-311, 2005.

DEZOTTI, M. 2008. **Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos**. Rio de Janeiro: e-papers, 2008.

DUBEY, M.; RAJPAL, A.; VELLANKI, B. P.; KAZMI, A.A. Occurrence, removal, and mass balance of contaminants of emerging concern in biological nutrient removal-based sewage treatment plants: Role of redox conditions in biotransformation and sorption. **Science of the Total Environment**. v. 808(2022)152131, 2022.

ESPERANZA, M.; SUIDAN, M.; MARFIL-VEGA, R.; GONZALEZ, C.; SORIAL, G.; McCAULEY P.; BRENNER, R. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. **Chemosphere**. v. 66(2007)1535-1544, 2006.

FANG, T.; PRAVEENA, S.; deBUBURE, C.; ARIS, A. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples – A review. **Chemosphere**. V. 165(2016)358-368, 2016.

FANG, T.; PRAVEENA, S.; deBUBURE, C.; ARIS, A.; ISMAIL, S.; RASDI, I. Quantification of selected steroid hormones (17 β -Estradiol and 17 α -Ethinylestradiol) in wastewater treatment plants in Klang Valley (Malaysia). **Chemosphere**. v. 215(2019)153162, 2019.

FERREIRA, M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂**. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia na Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, 2008.

FILHO, R.; ARAÚJO, J.; VIEIRA, E. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química nova**. v. 29 n.4, 817-822, 2006.

GABET-GIRAUD, V.; MIÈGE, C.; CHOUBERT, J.M; RUEL, S.; COQUERY, M. Occurrence and removal of estrogens and beta-blockers by various processes in wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**. v. 408(2010)42574269, 2010.

GERARDI, M. **The Microbiology of Anaerobic Digesters**. New Jersey: Wiley - Interscience, 2003.

GOMES, J. Análise da ocorrência do hormônio estrogênico, 17 α etinilestradiol, no Lago Paranoá. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ. Brasília, 2018.

GONSCHOROWSKI, G. **Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas CG/EM**. Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2013.

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(2012)5813-5833, 2012.

- HASHIMOTO, T.; MURAKAMI, T. Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments. **Water Research**. v. 43(2009)573-582, 2008.
- HOLLER, S.; TRÖSCH, W. Treatment of urban wastewater in a membrane bioreactor at high organic loading rates. **Journal of Biotechnology**. v. 92, n.2, p. 95 – 101, 2011.
- IVANOV, V.; LIM, J.; STABNIKOVA, O.; GIN, K. Biodegradation of estrogens by facultative anaerobic iron-reducing bacteria. **Process Biochemistry**. v. 45(2010)284-287, 2009.
- JELIC, A.; GROS, M.; GINEBREDA, A.; CESPEDES-SÁNCHEZ, R.; VENTURA, F.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. **Water Research**. v. 45(2011)1165-1176, 2010.
- JIANG, Y.; WANG, H.; SHANG, Y.; YANG, K. Simultaneous removal of aniline, nitrogen and phosphorus in batch reactor. **Bioresource Technology**. v. 207(2016)422-429, 2016.
- JORDÃO, E.; PESSÔA, C. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. Ed. ABES. 6ª edição. 2011.
- JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T.; RICHLE, P. R.; SIEGRIST, H. Removal of Estrogens in Municipal Wastewater Treatment under Aerobic and Anaerobic Conditions: Consequences for Plant Optimization. **Environmental Science and Technology**. v. 38, 3047-3055, 2004.
- KASSOTAKI, E.; PIJUAN, M.; RODRIGUEZ-RODA, I.; BUTTIGLIERI, G. Comparative assessment of endocrine disrupting compounds removal in heterotrophic and enriched nitrifying biomass. **Chemosphere**. v. 217(2019)659-668, 2019.
- KENT, J.; TAY, JH. Treatment of 17 α -ethinylestradiol, 4-nonylphenol, and carbamazepine in wastewater using an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. **Science of the Total Environment**. v. 652:1270-1278, 2019.
- KHASAWNEH, O. F. S.; PALANIANDY, P. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 150, p. 532-556, 2021.
- KHUNJAR, W.; MACKINTOSH, S.; SKOTNICKA-PITAK, J.; BAIK, S.; AGA, D.; LOVE, N. Elucidating the relative roles of ammonia oxidizing and heterotrophic bacteria during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol and trimethoprim. **Environmental Science & Technology**. v. 45, 3605-3612, 2011.
- KOIFMAN, S.; PAUMGARTTEN, F. O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**. v.18(2):354-355, mar-abr,2002.
- KUMAR, V.; NAKADA, N.; YASOJIMA, M.; YAMASHITA, N.; JOHNSON, A.; TANAKA, H. The arrival and discharge of conjugated estrogens from a range of different sewage treatment plants in the UK. **Chemosphere**. v. 82(2011)1124-1128, 2010.

- LAFLEUR, A.; SCHUG, K. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Analytica Chimica Acta**. v. 696(2011)6-26, 2011.
- LI, X.; CHEN, H.; YANG, Q.; WANG, D.; LUO, K.; ZENG, G. Biological nutrient removal in a sequencing batch reactor operated as oxic/anoxic/extended-idle regime. **Chemosphere**. v. 105(2014)75-81, 2014.
- LI, C.; LAN, L.; TADDA, M.; ZHU, S.; YE, Z.; LIU, D. Interaction between 17 β -estradiol degradation and nitrification in mariculture wastewater by *Nitrosomonas europaea* and MBBR. **Science of The Total Environment**. v. 705(2020)135846, 2020.
- LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment – IUPAC Technical Report. **Pure Applied Chemistry**. v. 75(2003)631-681, 2003.
- LISHMAN, L.; SMYTH, S.; SARAFIN, K.; KLEYWEGT, S.; TOITO, J, et al. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. **Science of the Total Environment**. v. 367(2006)544-558, 2006.
- LIU, S.; DAIGGER, G.T.; LIU, B.; ZHAO, W.; LIU, J. Enhanced performance of simultaneous carbon, nitrogen and phosphorous removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor (AOA-SBR) system by alternating the cycle times. **Bioresource Technology**. v. 301(2020)122750, 2020.
- LUCENA, W., S. **Determinação de estrogênios em afluentes da lagoa de Araruama - RJ**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 102 fls, 2013.
- LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H.; NGHIEM, L.; HAI, F. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**. v. 473-474(2014)619-641, 2014.
- MANICKUM, T.; JOHN, W. The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 17, p. 4949–4970, 2015.
- METCALF, L.; EDDY, H. **Tratamento de Efluentes e Recuperação de Recursos**. Tradução: Ivanildo Hespagnol, José Carlos Mierzwa. 5a ed. Porto Alegre: AMGH, 2016. Título original: Wastewater Engineering: Treatment and Reuse.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª ed. Brasília, 2009.
- MINISTÉRIO DAS CIDADES - SECRETARIA NACIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento - SNIS. **Diagnóstico dos serviços de água e esgotos** - 2018, 2019.
- MOORE, S. C.; MATTHEWS, C. E.; OU, X.; YU, K.; JI, B. T.; CHOW, W. H.; CAI, Q.; LI, H.; YANG, G.; RUGGIERI, D.; BOYD-MORIN, J.; ROTHMAN, N.; HOOVER, RN.; GAO,

YT.; ZHENG, W.; ZIEGLER, RG. Endogenous estrogen metabolites, and breast cancer risk in postmenopausal chinese women. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 108(10), 2016.

MOTA, F.S.B; SPERLING, V. **Esgoto – Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. Editora ABES, 2009.

NAKAMURA, S.; SIAN, T.; DAISHIMA, S. Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 919(2001)275-282, 2001.

NELLES, J.; HU, W.; PRINS, G. Estrogen action and prostate cancer. **National Institutes of Health**. v. 6(3): 437-451, 2012.

NGUYEN, P.Y.; CARVALHO, G.; REIS, M.; OEHMEN, A. A review of the biotransformations of priority pharmaceuticals in biological wastewater treatment process. **Water Research**. v. 188(2021)116446, 2021.

OLIVEIRA, N. **A relevância da prescrição e do uso racional de medicamentos para mitigar potenciais riscos à saúde e ao meio ambiente**. Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2015.

OSACHOFF, H.; MOHAMMADALI, M.; SKIRROW, R.; HALL, E.; BROWN, L, et al. Evaluating the treatment of a synthetic wastewater containing a pharmaceutical and personal care product chemical cocktail: Compound removal efficiency and effects on juvenile rainbow trout. **Water Research**. v. 62(2014)271-280, 2014.

PANTER, G.; THOMPSON, R.; SUMPTER, J. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephalespromelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. **Aquatic Toxicology**. v. 42(4): 243-253, 1998.

PANTER, G.; THOMPSON, R.; SUMPTER, J. Intermittent Exposure os fish to estradiol. **Environmental Science Technology**. v. 34(13): 2756-2760, 2000.

PAULA, L. **Avaliação da remoção simultânea de matéria orgânica, nutrientes, e 17 α etinilestradiol pelo sistema de tratamento de esgotos por reator em batelada sequencial**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Escola Nacional de Saúde Pública, área de concentração Saneamento Ambiental - FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2017.

PESSOA, G. **Avaliação de desreguladores endócrinos e do micropoluente colesterol em estações de tratamento de esgoto sanitário**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Civil, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

PESSOA, G. P.; SOUZA, N. C.; VIDAL, C. B.; ALVES, J. A. C.; FIRMINO, P. I. M.; NASCIMENTO, R. F.; SANTOS, A. B. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, 288–295, 2014.

PETRIE, B.; MCADAM, E.; HASSARD, F.; STEPHENSON, T.; LESTER, J.; CARTMELL, E. Diagnostic investigation of steroid estrogen removal by activated sludge at varying solids retention time. **Chemosphere**. v. 113(2014)101-108, 2014.

QUEIROZ, F.B.; BRANDT, E.M.F.; AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L.; AFONSO, R.J.C.F. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. **Water Science & Technology**, v. 6612, p. 2562-2569, 2012.

ROBINSON, C.D.; BROWN, E.; CRAFT, J.A.; DAVIES, I.M.; MOFFAT, C.F.; PIRIE, D.; ROBERTSON, F.; STAGG, R.M.; STRUTHERS, S. Effects of sewage effluent and ethyniloestradiol upon molecular markers of estrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). **Aquatic Toxicology**. v. 24;62(2): 119-34, 2003.

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

ROUT, P.R.; SHAHID, M.K.; DASH, R.R.; BHUNIA, P.; LIU, D.; VARJANI, S.; ZHANG, T.C.; SURAMPALLI, R.U. Nutrient removal from domestic wastewater: A comprehensive review on conventional and advanced technologies. **Journal of Environmental Management**. v. 296(2021)113246, 2021.

SALLA, R.; GAMERO, F.; RISSOLI, R.; DAL-MEDICO, S.; CASTANHO, L.; CARVALHO, C.; SILVA-ZACARIN, E.; KALININ, A.; ABDALLA, F.; COSTA, M. Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**. v. 144: 1862-1868, 2016.

SANTOS, E. **Remoção de etinilestradiol no tratamento de água para consumo humano: estudo em escala piloto**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

SERVOS, M.; BENNIE, D.; BURNISON, B.; JURKOVIC, A.; McINNIS, R.; NEHELI, T.; SCHNELL, A.; SETO, P.; SMYTH, S.; TERNES, T. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**. v. 336(2005)155-170, 2004.

SHI, J.; CHEN, Q.; LIU, X.; ZHAN, X.; LI, J.; LI, Z. 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(2013)107-114. 2013

SKOOG, D.; JAMES, H.; WEST, D. **Fundamentos de Química Analítica – 9ª ed.**2014. Editora Cengage Learning.

SONG, H.; NAKANO, K.; TANIGUCHI, T.; NOMURA, M.; NISHIMURA, O. Estrogen removal from treated municipal effluent in small-scale constructed wetland with different depth. **Bioresource Technology**. v.100(2009)2945-2951. 2009.

SOUZA, T. **Eficiência de um reator em batelada sequencial combinado com UV/H₂O para remoção de 17 α -etinilestradiol (EE2) e 17 β -estradiol (E2) em esgoto.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Escola Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente - FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2019.

SUAREZ, S.; LEMA, J.; OMIL, F. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and desnitrifying conditions. **Water Research**. v. 44(2010)32143224, 2010.

SUN, Y.; HUANG, H.; SUN, Y., WANG, C.; SHI, X.; HU, H.; KAMEYA, T.; FUJIE, K. Ecological risk of estrogenic endocrine disrupting chemicals in sewage plant effluent and reclaimed water. **Environmental Pollution**. v. 180(2013)339-344, 2013.

SURANA, D.; GUPTA, J.; SHARMA, S.; KUMAR, S.; GHOSH, P. A review on advances in removal of endocrine disrupting compounds from aquatic matrices: Future perspectives on utilization of agri-waste based adsorbents. **Science of the Total Environment**. 826(2022)154129, 2022.

SWART, N.; POOL, E. Rapid detection of selected steroid hormones from sewage effluents using an ELISA in the kuils river water catchment area, South Africa. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**. v. 28:4 395-408, 2007.

TORRESI, E.; TANG, K.; DENG, K.; SUND, C.; SMETS, BF.; CHRISTENSSON, M.; ANDERSEN H. Removal of micropollutants during biological phosphorus removal: impact of redox conditions in MBBR. **Science of the Total Environment**. v. 663:496-506, 2019.

U.S.EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis.** Washington, 1997.

U.S.EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Endocrine Disruption**. 2017. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrinedisruption/what-endocrine-disruption>. Acesso em: 04 mar.2020.

U.S.EPA - United States Environmental Protection Agency. **Environmental Technology Verification Report. Ethynylestradiol (EE2) microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Test Kits.** Abraxis Ecologena. Setembro, 2009. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P1007YEU.txt>. Acesso em: 04 mar. 2020.

VADER, J.S.; VAN GINKEL, C.G.; SPERLING, F.M.G.M.; JONG, J.; BOER, W.; GRAAF, J.S.; VAN DER MOST, M.; STOKMAN, P.G.W. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. **Chemosphere**. v. 41, n.8, p. 1239-1243, 2000.

VAN HAANDEL, A.; MARAIS, G. **O comportamento do sistema de lodo ativado Teoria e Aplicações para projetos e operação.** Ed. Epgraf. 1999.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias.** Ed. UFMG. Vol. 4. 3ª edição. 2012.

WIDMAIER, E.P.; RAFF, H.; STRANG, K.T. Vander - **Fisiologia Humana – Os mecanismos das funções corporais**. 12 ed. 2013.

WRAGE, N.; VELTHOF, G.L.; VAN BEUSICHEM, M.L.; OENEMA, O. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 33(2001)1723-1732, 2001.

ZHANG, Z.; FENG, Y.; GAO, P.; WANG, C.; REN, N. Occurrence and removal efficiencies of eight EDCs and estrogenicity in a STP. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 5 p.1366-73, 2011.

ZHENG, J.; HU, M.; ZHU, L. Removal behaviors of aerobic granular sludge on estrogens: Adsorption kinetics and removal mechanism. **Journal of Water Process Engineering**, v. 44(2021)102410, 2021.