

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Tratamento de esgoto doméstico por consórcio microalgas/bactérias para
remoção de toxicidade e síntese de bioplástico.**

Priscila Romana da Silva
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

PRISCILA ROMANA DA SILVA

**Tratamento de esgoto doméstico por consórcio microalgas/bactérias para
remoção de toxicidade e síntese de bioplástico.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Ann Honor Munteer

Coorientadora: Maria Lucia Calijuri

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586t
2025

Silva, Priscila Romana da, 1986-
Tratamento de esgoto doméstico por consórcio
microalgas/bactérias para remoção de toxicidade e síntese de
bioplástico / Priscila Romana da Silva. – Viçosa, MG, 2025.
1 tese eletrônica (145 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Ann Honor Mounter.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Engenharia Civil, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.447>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Esgotos - Tratamento. 2. Águas residuais - Purificação.
3. Biodegradação. 4. Fitotoxicidade. 5. Fotodegradação.
I. Mounter, Ann Honor, 1959-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Civil. III. Título.

CDD 22. ed. 628.35

PRISCILA ROMANA DA SILVA

Tratamento de esgoto doméstico por consórcio microalgas/bactérias para remoção de toxicidade e síntese de bioplástico.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de abril de 2025.

Assentimento:

Priscila Romana da Silva
Autora

Ann Honor Mounteer
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 08/07/2025 às 14:42:27 e pela orientadora em 08/07/2025 às 15:08:36. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **XLBS.KCKE.V4JN** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me permitir chegar até aqui.

À minha família, por todo amor e suporte ao longo da minha jornada.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À orientadora Ann H. Mounteer e à coorientadora Maria Lúcia Calijuri, pela confiança e pelos ensinamentos.

Aos amigos feitos no LESA e aos colegas de trabalho, por toda ajuda durante esse período.

Aos estagiários Taiane Isoldi, Yasmin Guimarães, Juan Esteban e Millena Braga, pela dedicação e grande ajuda durante os experimentos.

A tantas outras pessoas que contribuíram com esse trabalho, direta e indiretamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SILVA, Priscila Romana da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2025. **Tratamento de esgoto doméstico por consórcio microalgas/bactérias para remoção de toxicidade e síntese de bioplástico.** Orientadora: Ann Honor Mounteer. Coorientadora: Maria Lucia Calijuri.

Estudos anteriores demonstraram a eficiência de consórcios microalgas-bactérias na remoção de matéria orgânica, nutrientes, microrganismos patogênicos e alguns micropoluentes orgânicos do esgoto sanitário. No entanto, a remoção de compostos responsáveis pela toxicidade e pela atividade estrogênica foram estimados apenas pela remoção dos compostos originais, sem considerar os produtos de degradação incompleta e os potenciais efeitos interativos da mistura desses produtos formados. Portanto, nesse trabalho, uma abordagem direcionada aos efeitos nocivos foi realizada, para investigar a remoção de toxicidade e de atividade estrogênica por consórcio de microalgas-bactérias em esgoto doméstico tratado anaerobiamente. Bactérias heterotróficas presentes no esgoto municipal classificado como altamente tóxico reduziram a toxicidade pela metade em condições aeróbias; no entanto, apenas o consórcio de microalgas-bactérias eliminou a toxicidade após 48 h. A atividade estrogênica foi eliminada em 48 h nas frações de sólidos com tamanho inferior a $0,45\ \mu\text{m}$ e superior a $0,7\ \mu\text{m}$, restando menos de 6% nos sólidos intermediários (entre $0,45$ e $0,7\ \mu\text{m}$). Os resultados confirmam a capacidade do consórcio de remover eficazmente a toxicidade e a atividade estrogênica do esgoto sanitário, não apenas os compostos originalmente tóxicos ou estrogênicos, mas também seus produtos de transformação, com a participação ativa do metabolismo bacteriano e microalgal. Após a verificação da biorremediação do esgoto doméstico por consórcio microalgas-bactérias em escala de bancada, foi realizado o tratamento do esgoto em lagoas de alta taxa (LATs) em escala piloto para a produção de biomassa e síntese de bioplástico. Os plásticos foram produzidos de duas formas: 1) diretamente com a biomassa obtida no tratamento e, 2) com uma solução proteica extraída da biomassa. Nas duas formulações foi incorporado gelatina comercial para a formação dos filmes plásticos, além disso, dois compósitos (amido de milho e óxido de magnésio) foram adicionados para verificar a redução de solubilidade dos plásticos em água. A formulação conjunta de proteína solubilizada, amido de milho e óxido de magnésio resultou em bioplásticos resistentes à imersão em água e sem efeito fitotóxico para sementes de rúcula. Dessa forma, o uso de consórcios microalgas-bactérias apresenta grande potencial como tecnologia sustentável para o tratamento de esgotos e

valorização de resíduos por meio da produção de bioplásticos. Os resultados obtidos contribuem para a otimização de processos em escala laboratorial e abrem caminho para futuras investigações sobre a viabilidade técnica, ambiental e econômica em escala industrial.

Palavras-chave: biodegradação; estroginicidade; fitotoxicidade; fotodegradação; intumescimento

ABSTRACT

SILVA, Priscila Romana da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2025. **Domestic sewage treatment by microalgae-bacteria consortia for toxicity removal and bioplastic synthesis.** Adviser: Ann Honor Mouteer. Co-adviser: Maria Lucia Calijuri.

Sewage treatment by microalgae-bacteria consortia has been shown to satisfactorily reduce organic matter, nutrients, pathogenic microorganisms and some organic micropollutants, but toxicity and estrogenic activity has only been estimated by removal of parent compounds responsible for this biological activity, without regard to the incomplete degradation byproducts or the potential interactive effects of the mixture of the degradation products. Therefore, an effects directed approach was undertaken to investigate estrogenic activity and toxicity removals by a microalgae-bacteria consortia in anaerobically treated municipal sewage. Heterotrophic bacteria present in municipal sewage, classified as highly toxic, reduced toxicity by half under aerobic conditions; however, only the microalgae-bacteria consortium eliminated toxicity after 48 hours. Estrogenic activity was eliminated within 48 h in the low ($< 0.45 \mu\text{m}$) and high ($> 0.7 \mu\text{m}$) sewage solid fractions, with less than 6% remaining in the solids between 0.45 and $0.7 \mu\text{m}$. These results confirm the consortium's capacity to effectively remove not only the parent toxic or estrogenic compounds but also their transformation products, through the combined metabolic activity of microalgae and bacteria. Following the bench-scale demonstration of domestic sewage bioremediation, pilot-scale treatment was conducted in high-rate algal ponds for biomass production and bioplastic synthesis. Bioplastics were produced using two approaches: (1) directly from the biomass obtained during treatment and (2) from an alkaline protein biomass extract. Commercial animal gelatin was incorporated into both formulations to produce plastic films. Additionally, two additives (cornstarch and magnesium oxide) were included to evaluate reductions in the water solubility of the plastics. The formulation with solubilized protein, cornstarch, and magnesium oxide produced bioplastics resistant to water immersion and free from phytotoxic effects, as shown in germination tests. These findings reinforce the potential of microalgae-bacteria consortia as a sustainable solution for sewage treatment and bioplastic production. The results support process optimization and future studies on industrial-scale feasibility.

Keywords: biodegradation; estrogenicity; phytotoxicity; photodegradation; swelling

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2	HIPÓTESES	12
3	OBJETIVOS	12
3.1	Objetivo Geral.....	12
3.2	Objetivos Específicos.....	12
4	REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS AMBIENTAIS E ATIVIDADE ESTROGÊNICA POR MICROALGAS E CONSÓRCIO MICROALGAS-BACTÉRIAS: REVISÃO DA LITERATURA	14
4.1	Introdução	15
4.2	Desreguladores endócrinos	16
4.3	Estrogênios ambientais	17
4.4	Legislação	19
4.5	Remoção de estrogênios ambientais e toxicidade em reator UASB.....	20
4.6	Sistemas UASB-microalgas-bactérias na redução de toxicidade e micropoluentes	21
4.7	Revisão bibliométrica: remoção de estrogênios ambientais por microalgas e consórcio de microalgas	22
4.7.1	Discussão dos resultados bibliométricos	24
4.7.2	Principais mecanismos de remoção.....	32
4.7.3	Eficiência de remoção de estrogênios ambientais	34
4.7.4	Remoção de atividade estrogênica	38
4.7.5	Desafios e limitações	41
4.8	Conclusão.....	43
8.1	Referências.....	45
5	REMOÇÃO DE TOXICIDADE E ATIVIDADE ESTROGÊNICA DO EFLUENTE DO REATOR UASB POR CONSÓRCIO MICROALGAS-BACTÉRIAS.....	55
5.1	Introdução	55
5.2	Material e Métodos	57
5.2.1	Efluente.....	58
5.2.2	Inóculos	58
5.2.3	Extração da matéria orgânica extracelular.....	58
5.2.4	Seleção da densidade celular	59
5.2.5	Reatores	59
5.2.6	Arranjo experimental.....	59
5.2.7	Mecanismos de remoção de toxicidade e atividade estrogênica	60
5.2.8	Caracterização física e química	61
5.2.9	Toxicidade aguda.....	62
5.2.10	Toxicidade crônica	63
5.2.11	Atividade estrogênica	63
5.2.12	Análise estatística	66
5.3	Resultados e Discussão	67

5.3.1	Toxicidade a Ceriodaphnia dubia	67
5.3.1.1	Seleção de densidade microalgal	67
5.3.2	Atividade estrogênica	80
5.4	Conclusão.....	85
8.2	Referências.....	86
6	PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL EM LAGOAS DE ALTA TAXA E SÍNTESE DE BIOPLÁSTICO	91
6.1	Introdução	91
6.2	Material e Métodos	94
6.2.1	Tratamento do efluente e produção de biomassa.....	94
6.2.2	Caracterização do efluente.....	95
6.2.3	Caracterização da biomassa.....	95
6.2.4	Extração de proteína	96
6.2.5	Síntese de bioplástico	97
6.2.6	Intumescimento	99
6.2.7	Microscopia eletrônica de varredura	99
6.2.8	Ensaio de germinação.....	99
6.2.9	Análises estatísticas	101
6.3	Resultados e discussão	101
6.3.1	Tratamento do efluente em LATs.....	101
6.3.2	Biomassa de microalgas	104
6.3.3	Extração de proteínas.....	105
6.3.4	Bioplástico	109
6.4	Conclusão.....	115
8.3	Referências.....	117
7	CONCLUSÃO GERAL.....	122
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICE	138

1 INTRODUÇÃO GERAL

O lançamento de esgotos sanitários sem tratamento ou apenas parcialmente tratados nos corpos d'água receptores pode comprometer a qualidade dos recursos hídricos e provocar consequências nocivas para o equilíbrio ambiental e a saúde da população. No contexto brasileiro, esses lançamentos ainda constituem a principal fonte de poluição dos recursos hídricos (ANA, 2017).

Para o lançamento desses despejos é necessário tratamento prévio, com o objetivo de atender aos padrões de emissão que visam a preservação dos recursos hídricos e a manutenção da vida aquática. Além de atender a padrões físico-químicos, o lançamento de efluentes de sistemas de tratamento não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor (CONAMA, 2011; COPAM/CERH-MG, 2022). Para avaliação desses efeitos são utilizados ensaios ecotoxicológicos capazes de sinalizar potenciais efeitos tóxicos e os mecanismos de ação de compostos químicos em diferentes organismos-teste. Esses ensaios representam uma ferramenta de grande importância na avaliação ambiental, pois certos aspectos essenciais não são avaliados por variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e os efeitos da interação de poluentes sobre os organismos (Alves *et al.*, 2024)

Devido à diversidade dos processos industriais e dos produtos de uso doméstico, os esgotos sanitários, mesmo após o tratamento, podem conter compostos potencialmente tóxicos para os organismos aquáticos. Dentre eles estão os desreguladores endócrinos (DE), compostos capazes de interferir nas funções do sistema endócrino, e assim interromper a síntese, imitar, bloquear ou remover os hormônios naturais dos seus receptores, mesmo em concentrações na faixa de ng.L^{-1} (Yilmaz *et al.*, 2020).

Os DE são amplamente detectados em corpos d'água de diferentes regiões do mundo (de Rezende; Mounteer, 2023; Horak; Horn; Pieters, 2021; López-Velázquez *et al.*, 2025; Nathanael; Adyanis; Oginawati, 2024; Ng, Brian *et al.*, 2021; Salgueiro-González *et al.*, 2015). Entre eles, um grupo de destaque é o das substâncias estrogênicas, que são substâncias capazes de agir de forma similar ou bloquear a ação do hormônio feminino natural 17β -estradiol. A exposição de organismos aquáticos a essas substâncias pode causar feminização de peixes machos, diminuição de eclosão de ovos de pássaros, tartarugas e peixes e aumento da incidência de câncer de mama, próstata e testículo em seres humanos (Bila; Dezotti, 2007; Lacouture *et al.*, 2022).

Entre as tecnologias mais encontradas no Brasil para tratamento de esgotos sanitários, os reatores anaeróbios estão presentes como único processo de tratamento biológico em 12% das estações de tratamento de esgotos (ETEs) (ANA, 2017). Os sistemas do tipo reatores anaeróbios de fluxo ascendente (*upflow anaerobic sludge blanket* - UASB) são uma tecnologia bem difundida no Brasil por apresentar eficiência na remoção de matéria orgânica e sólidos em suspensão, aliados aos baixos custos de implementação e operação. No entanto, não promovem a remoção de nutrientes e de micropoluentes responsáveis por efeitos tóxicos e estrogênicos no ambiente aquático (Düpont; Lobo, 2012; Lutterbeck *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021; Vassalle *et al.*, 2020).

Ao considerar limitações associadas aos sistemas anaeróbios em gerar efluentes capazes de atender aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental, faz-se necessário a implementação de tecnologias de pós-tratamento com o objetivo de polimento das qualidades física, química, microbiológica e ecotoxicológica do efluente. Processos de oxidação avançada demonstram alta eficiência na remoção de DE, mas impõem desafios como alto consumo energético e potencial geração de subprodutos tóxicos (Katibi *et al.*, 2021). A adsorção em carvão ativado transfere poluentes para outra fase, com limitações na regeneração do carvão e eficiência de remoção para certos compostos (Zieliński; Miądlicki; Przepiórski, 2022). Tecnologias de membrana (nanofiltração, osmose reversa) retêm micropoluentes, mas operam sob alta pressão e podem apresentar passagem de DE de baixo peso molecular (Katibi *et al.*, 2021). Sistemas híbridos anaeróbios-osmóticos acoplados à destilação por membrana mostram desempenho eficaz na remoção de toxicidade e estrogenicidade, mas enfrentam desafios operacionais e custos elevados (Arcanjo *et al.*, 2022; dos Santos *et al.*, 2025). Tais limitações reforçam a necessidade de soluções simplificadas como pós-tratamento de reatores anaeróbios para remoção de nutrientes e micropoluentes.

Nos últimos anos, a percepção da necessidade de fontes alternativas de energia limpa que causem menos impacto no ambiente e na vida humana, associada à crise hídrica, concedeu destaque à utilização de microalgas para o tratamento de efluentes e sua posterior conversão em bioprodutos (Rawat *et al.*, 2011). As microalgas utilizam compostos inorgânicos, como carbono, nitrogênio, fósforo e oligoelementos para seu crescimento e produzem materiais orgânicos, como carboidratos, lipídios, proteínas e amido, que podem ser utilizados em diversas aplicações industriais (Sudhakar *et al.*, 2024). Muitos estudos sobre o emprego do consórcio microalgas-bactérias para tratamento de efluentes apresentaram reduções satisfatórias de matéria orgânica, nutrientes, microrganismos patogênicos e diversos micropoluentes orgânicos (de Assis *et al.*, 2017; Lutterbeck *et al.*, 2018; Matamoros *et al.*, 2015).

No entanto, pesquisas com micropoluentes de preocupação emergente e microalgas normalmente avaliam a remoção de determinados compostos em meio de cultivo ou efluente sintético (Wang et al., 2019; Wu et al., 2021). Há poucos estudos com efluentes reais (Matamoros *et al.*, 2015; Vassalle *et al.*, 2020), bem como sobre efeitos da interação dos poluentes presentes nessas matrizes complexas (Zhou *et al.*, 2014). Não foram encontrados estudos na literatura demonstrando as vantagens do uso combinado de reatores anaeróbios e consórcio microalgas-bactérias no que tange a toxicidade e estrogenicidade do efluente final e quais os mecanismos envolvidos na remoção.

Nesse contexto de busca por soluções sustentáveis para o tratamento de efluentes, o presente estudo propõe uma abordagem integrada que avalia tanto a eficácia de consórcios microalgas-bactérias na remoção de poluentes tóxicos e estrogênicos do efluente de reator UASB, quanto o potencial de valorização da biomassa microalgal resultante do tratamento de efluente de tanque séptico em LATs para a síntese de bioplástico. Essa perspectiva alinha o tratamento eficiente de esgotos com a produção de materiais de valor agregado, promovendo uma abordagem de economia circular e contribuindo para o desenvolvimento de soluções ambientais e tecnológicas mais integradas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a biorremediação do efluente do reator UASB por meio do pós-tratamento com consórcio microalgas-bactérias em reatores de bancada e produzir bioplástico com a biomassa microalgal proveniente do tratamento do efluente de tanque séptico em LATs.

Este documento inicia com esta introdução geral da pesquisa, seguida pelas hipóteses que fundamentaram o estudo e pelos objetivos propostos. Em seguida, é apresentada uma revisão da literatura sobre a remoção de compostos estrogênicos por microalgas e consórcios de microalgas. As pesquisas laboratoriais são detalhadas em duas partes: a primeira aborda a remoção de toxicidade e atividade estrogênica do efluente do reator UASB por um consórcio microalgas-bactérias em escala de bancada, e a segunda aborda o tratamento de efluente de tanque séptico em escala piloto para a produção de biomassa microalgal e síntese de bioplástico. O trabalho é concluído com uma análise geral dos resultados da pesquisa.

2 HIPÓTESES

1. O tratamento terciário com consórcio microalgas-bactérias remove por completo a toxicidade e a atividade estrogênica do esgoto sanitário tratado por reator anaeróbio.
2. A biodegradação pelo consórcio microalgas-bactérias é o principal mecanismo de remoção de atividade estrogênica e de toxicidade do efluente secundário.
3. A produção de bioplásticos a partir da biomassa de microalgas-bactérias gerada no tratamento terciário do esgoto sanitário é viável sob o ponto de vista técnico, enquanto rota de aproveitamento dessa biomassa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

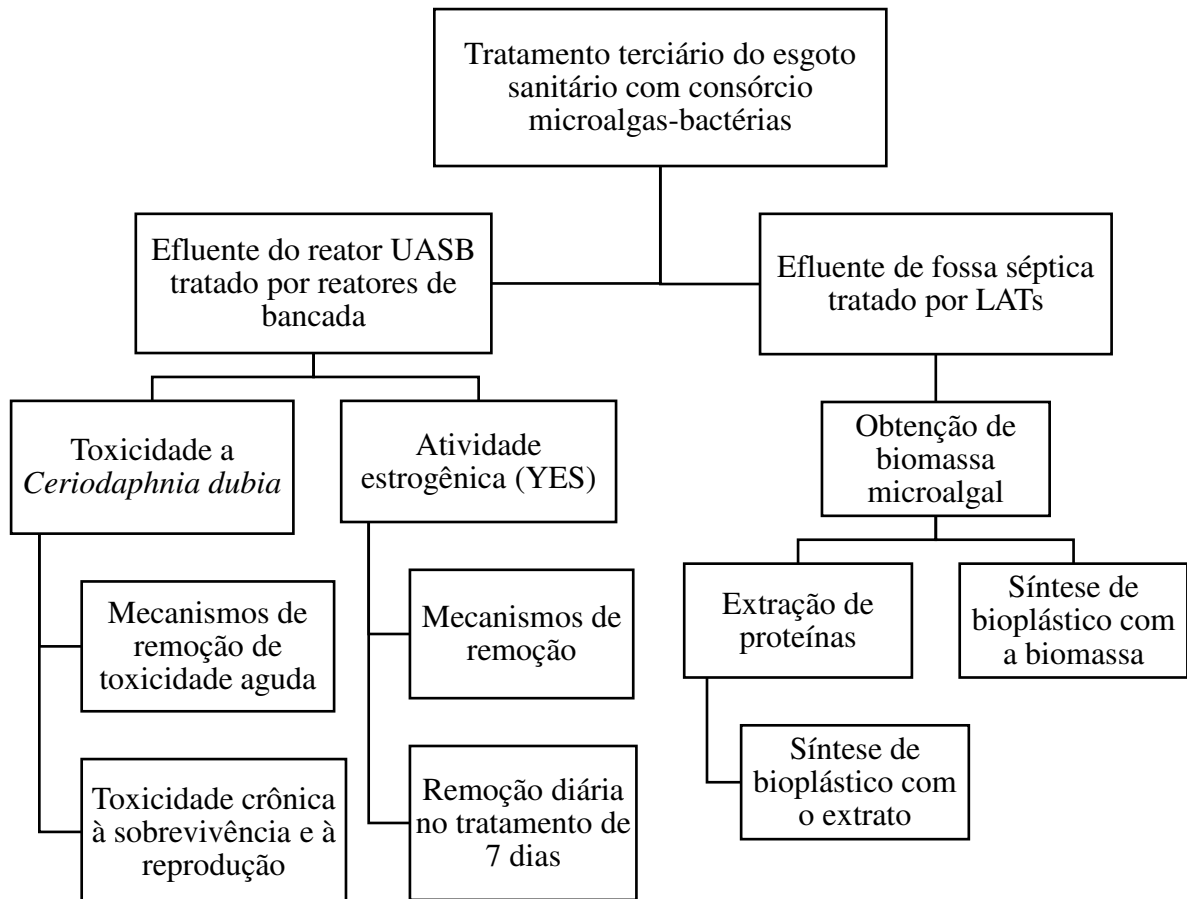
Avaliar a biorremediação do efluente do reator UASB por meio do pós-tratamento com consórcio microalgas-bactérias em reatores de bancada e produzir bioplástico com a biomassa microalgal proveniente do tratamento do efluente de tanque séptico em LATs.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o potencial do consórcio microalgas-bactérias de remoção da atividade estrogênica e da toxicidade do efluente do reator UASB.
2. Avaliar os mecanismos de remoção de toxicidade e de atividade estrogênica pelo tratamento terciário com consórcio microalgas-bactérias: sorção, biodegradação e fotodegradação.
3. Avaliar a produção de bioplástico com a biomassa obtida no tratamento terciário do esgoto sanitário com consórcio microalgas-bactérias por um processo simplificado.

As etapas experimentais desta pesquisa estão detalhadas no fluxograma apresentado na Figura 1, de forma a contemplar os objetivos propostos.

Figura 1 – Fluxograma detalhado das etapas experimentais envolvidas neste estudo.



Fonte: elaboração própria

4 REMOÇÃO DE ESTROGÊNIO AMBIENTAIS E ATIVIDADE ESTROGÊNICA POR MICROALGAS E CONSÓRCIO MICROALGAS-BACTÉRIAS: REVISÃO DA LITERATURA

Resumo

Micropoluentes, como os desreguladores endócrinos (DE) que incluem estrogênios naturais e sintéticos, representam uma preocupação crescente devido aos seus efeitos adversos na saúde humana e no meio ambiente. Inicialmente, este estudo apresenta uma revisão da literatura sobre a ocorrência e remoção de micropoluentes e de toxicidade no tratamento por reatores anaeróbios de fluxo ascendente (*upflow anaerobic sludge blanket* - UASB) e em sistemas baseados em microalgas e consórcios microalgas-bactérias. Adicionalmente, foi desenvolvida uma revisão integrativa da literatura sobre a remoção de estrogênios ambientais (*environmental estrogens* – EEs) por microalgas e consórcio de microalgas em sistemas aquosos. O levantamento para essa revisão resultou em 267 artigos científicos das bases de dados *Scopus* e *Web of Science*. Após avaliação detalhada, 24 artigos atenderam aos critérios de busca e foram aceitos neste estudo. Destes, apenas três pesquisas foram realizadas em escala piloto. O meio aquoso predominante foi meio de cultivo, seguido de águas residuárias e efluente sintético. Os estrógenos mais pesquisados foram 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1). *Chlorella vulgaris* (eficiência média de remoção de 49,3%) e *Selenastrum capricornutum* (78,9%) foram as microalgas mais comumente usadas, seguidas por consórcios microalgas-bactérias (58,5%). A biodegradação e a fotodegradação foram os principais mecanismos de remoção de EEs relatados nas pesquisas. A atividade estrogênica foi quantificada em seis estudos, com eficiência média de remoção de 53%; contudo, nenhum estudo avaliou a remoção em águas residuárias reais sem manipulação prévia, limitando a compreensão do desempenho nessas condições complexas. Apesar dos avanços evidenciados, persistem desafios importantes como a toxicidade dos EEs para microalgas, a formação de subprodutos com atividade estrogênica e a necessidade de estudos em larga escala para melhor compreensão das interações ecológicas.

Palavras-chave: Fitorremediação; Micropoluentes; Desreguladores endócrinos; Reator UASB

4.1 Introdução

A crescente preocupação com a presença de contaminantes emergentes em efluentes tem impulsionado pesquisas na área de tratamento de água e esgoto. Entre esses poluentes, destacam-se os DE, substâncias capazes de interferir no sistema endócrino de organismos vivos, causando efeitos adversos na saúde humana e animal (Yilmaz *et al.*, 2020). Os DE, presentes em diversas fontes como produtos farmacêuticos, pesticidas e produtos industriais, frequentemente atingem os ecossistemas aquáticos por meio de esgotos domésticos, industriais e águas pluviais (Liu, Bo; Zhang; Chang, 2019). As estações de tratamento de esgoto (ETE) convencionais nem sempre são eficazes na remoção desses compostos, o que leva à sua persistência nos corpos hídricos e à potencial biomagnificação ao longo da cadeia alimentar (Cheng, Ning *et al.*, 2021; Liu, Bo; Zhang; Chang, 2019; Silva *et al.*, 2021). Diante desse cenário, torna-se fundamental o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias de tratamento mais eficientes e sustentáveis para a remoção de DE.

As microalgas são organismos de grande diversidade, produtores primários de energia e eficientes fixadores de dióxido de carbono pelo processo da fotossíntese. São encontradas principalmente em ambientes aquáticos e toleram ampla faixa de temperatura e radiação solar. Geralmente, possuem carga superficial negativa em pH na faixa de 7 a 10. São organismos livres, mas algumas microalgas podem viver em associação simbiótica com outros organismos, como bactérias e plantas aquáticas (Andrade; Colozzi Filho, 2014).

O tratamento de efluentes com o uso de microalgas recupera nutrientes, em sintonia com a bioeconomia circular e a integração de microalgas e bactérias pode oferecer benefícios simbióticos no tratamento (Aditya *et al.*, 2022). As microalgas fotossintéticas produzem oxigênio dissolvido (OD) e carbono orgânico úteis para bactérias que, por sua vez, fornecem o carbono inorgânico necessário para o desenvolvimento microalgal (Fallahi *et al.*, 2021). Apesar das vantagens do tratamento de efluentes com o uso de consórcio microalgas-bactérias e do crescente interesse da biomassa produzida para a produção de bioprodutos de valor agregado, os estudos nesse campo têm se concentrado, principalmente, na remoção de nitrogênio, fósforo e metais (Ghaed *et al.*, 2025; Xiao *et al.*, 2025). Poucas pesquisas são realizadas com foco na remoção de DE e menos ainda na redução de atividade estrogênica e da toxicidade desses sistemas de tratamento (Wang, Yuwen *et al.*, 2019a; Wu, Pei Hsun *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2014).

Diante do exposto, este estudo apresenta uma revisão da literatura sobre o processo de tratamento anaeróbio por reatores UASB e de sistemas baseados no uso de microalgas, com

foco nos mecanismos de remoção envolvidos e nos fatores que influenciam o desempenho dessas tecnologias.

4.2 Desreguladores endócrinos

A pesquisa na área de tratamento de efluentes fez grandes avanços na identificação de diversos compostos detectados em baixas concentrações e que representam sérios danos ao meio ambiente e ameaças à saúde humana. Esses poluentes são produtos químicos naturais ou sintéticos de origem doméstica, municipal, industrial ou agrícola denominados contaminantes de preocupação emergente, em inglês, *contaminants of emerging concern* (CEC) (Kasonga *et al.*, 2021). Geralmente, incluem produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, poluentes orgânicos persistentes e DE (Liu, Bo; Zhang; Chang, 2019).

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que regula e integra funcionalidades entre as células, é responsável pelo crescimento, reprodução, metabolismo, homeostase e outros processos fisiológicos. É composto por diversas glândulas (pineal, hipófise, tireoide, paratireoide, supra-renais, pâncreas e gônadas) localizadas em diferentes partes do corpo que secretam hormônios com diferentes funções. Os hormônios sintetizados pelas glândulas são transportados pela corrente sanguínea para órgãos alvo, onde desencadeiam respostas naturais. (Birkett & Lester, 2002).

Os DE são substâncias exógenas ou misturas que mesmo em concentrações muito baixas (ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$) são capazes de interferir em funções do sistema endócrino, induzir respostas estrogênicas e alterar a reprodução e desenvolvimento animal (Briciu; Kot-Wasik; Namiesnik, 2009; Forner-Piquer *et al.*, 2020; Teng *et al.*, 2020). A desregulação do sistema endócrino ocorre quando os DE interrompem a síntese, imitam, bloqueiam ou removem os hormônios naturais dos seus receptores, o que provoca efeito adverso sobre a saúde do organismo, sua descendência ou subpopulações (Birkett; Lester, 2002).

Os DE podem ser agrupados em duas classes principais: (i) produtos sintéticos utilizados na agricultura, na indústria e seus subprodutos, como defensivos agrícolas, dioxinas, bifenilas policloradas, alquifenóis, ftalatos, bisfenol-A, metais tóxicos, estrogênios sintéticos; e (ii) compostos naturais, como fitoestrogênios e estrogênios (Bila; Dezotti, 2007). Os DE alcançam os ecossistemas aquáticos por meio das águas pluviais urbanas, águas agrícolas e, principalmente, por esgotos sanitários não tratados ou com tratamento insuficiente. Ao atingir os corpos d'água, os DE podem afetar seriamente a saúde humana a partir da biomagnificação, ou seja, pelo acúmulo progressivo dos poluentes de um nível trófico para outro ao longo da cadeia alimentar (Cheng, Ning *et al.*, 2021; Liu, Bo; Zhang; Chang, 2019).

4.3 Estrogênios ambientais

Os hormônios sexuais podem ser divididos em três grupos principais: (i) hormônios sexuais masculinos, ou andrógenos; (ii) hormônios sexuais femininos, ou estrógenos; e (iii) hormônios da gravidez, ou progestágenos (Filho; Vieira, 2006). Os estrógenos, que incluem estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3), são os principais hormônios sexuais femininos. Eles são secretados pelos ovários e desempenham um papel crucial no desenvolvimento de características femininas em um organismo. O fármaco 17 α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético desenvolvido para uso médico e amplamente utilizado em pílulas anticoncepcionais e de reposição hormonal (Fang *et al.*, 2016). A Figura 1 ilustra a estrutura química desses hormônios esteroides, que possuem em comum 17 átomos de carbono ligados em quatro estruturas cíclicas, massa molar entre 150 e 400 g.mol⁻¹ e, majoritariamente, lipofílicos (Sun *et al.*, 2023). Contêm um anel aromático (anel A), dois anéis de ciclohexano (anéis B e C) e um anel de ciclopentano (anel D) (Yu; Deeb; Chu, 2013). Esses estrogênios, naturais e sintéticos, são continuamente excretados pela urina e pelas fezes nos esgotos, o que confere a eles característica de constância nos sistemas aquáticos (Bila; Dezotti, 2007; Filho; Vieira, 2006).

Figura 1 – Estrutura química dos principais estrógenos naturais e sintéticos.



Fonte: Yu, Deeb e Chu (2013)

Um composto apresenta atividade estrogênica quando é capaz de se ligar ao receptor de estrogênio e imitar os estrogênios endógenos (Bila; Dezotti, 2007). Esses são os chamados estrogênios ambientais, em inglês, *environmental estrogens* (EEs), poluentes químicos presentes no ambiente que podem afetar as funções fisiológicas de humanos ou outros animais (Ma *et al.*, 2022). Os EEs podem ser divididos em estrogênios naturais e sintéticos, conforme apresentado na Figura 2. Os EEs sintéticos também são chamados de xenoestrogênios. Nas últimas décadas, pesquisas têm apresentado número crescente de compostos químicos que

possuem efeitos estrogênicos (Krishnan, 1993; Olea *et al.*, 1996; Quintaneiro *et al.*, 2017), sendo alguns desses compostos associados ao câncer de mama humano, como os compostos perfluoroalquilados (PFAS) e o herbicida glifosato (Omoike *et al.*, 2021; Thongprakaisang *et al.*, 2013).

Figura 2 - Classificação dos compostos que apresentam atividade estrogênica.

EEs Naturais	Estrógenos Animais	Estrona (E1) 17 α -estradiol (17 α -E2) 17 β -estradiol (E2) Estriol (E3)
	Fitoestrógenos	Isoflavonas Cumestanos Lignanas
Estrogênios Ambientais		Herbicidas: alacloro, glufosinato, glifosato, linuron, metolacloro, etc.
	Pesticidas sintetizados quimicamente	Fungicidas: benomil, carbendazim, hexaclorobenzeno, etc. Inseticida: diclorodifeniltricloroetano (DDT), clordano, endosulfan, carbaril, etc. Nematicida: carbofurano, dibromocloropropano, etc.
		Metais pesados: chumbo, cádmio, mercúrio, estanho, etc. Compostos fenólicos: nonilfenol (NP), octilfenol, bisfenol A, pentaclorofenol, etc.
	EEs Sintéticos	Matérias-primas e produtos químicos
		Óleo isolante: bifenilpoliclorado, etc. Compostos de éter: hidroxianisol butilado, etc. Ésteres de ftalatos: ftalato de benzilbutila, dibutilftalato, ftalato de dietila, etc. Outros: ácido perfluorooctanessulfônico, triclosan (TCS), etc.
	Compostos sintetizados para uso medicinal	Dietilestilbestrol, 1-bromo-2naftol, etinilestradiol (EE2), etc.
	Poluentes químicos ambientais	Dioxinas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, etc

Fonte: Ma et al. (2022)

A ocorrência de estrogênios ambientais nas estações de tratamento de esgotos (ETEs) e nos corpos d'água em várias partes do mundo é continuamente relatada pela comunidade científica (Dias *et al.*, 2015; Durcik *et al.*, 2023; Ekpeghere *et al.*, 2018; Martinovic-Weigelt *et al.*, 2013), o que evidencia que uma parcela significativa desses poluentes não é totalmente removida pelas ETEs e, conseqüentemente, lançada nos corpos hídricos.

A detecção e quantificação de EEs é trabalhosa, principalmente pela complexidade das matrizes aquáticas e pelas baixas concentrações presentes no meio. Em amostras de águas, e até mesmo de esgotos, é necessário utilizar a técnica de extração em fase sólida, onde grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos são quimicamente ligados a uma superfície sólida, ou seja, são concentrados e, em seguida, recuperados durante a etapa de eluição. Posteriormente, o material obtido é analisado por meio de técnicas analíticas instrumentais ou não instrumentais (Fang *et al.*, 2016).

As técnicas instrumentais são, principalmente, as cromatografias gasosa ou líquida acopladas à espectrometria de massas. As técnicas não instrumentais são os radioimunoensaios (RIA: reações antígeno-anticorpo com uso de radioisótopos), os ensaios imunoenzimáticos (ELISA: reações antígeno-anticorpo com uso de enzimas), ensaios com uso de leveduras (*Yeast Estrogen Screen* - YES) e ensaios E-screen, de proliferação celular de câncer de mama humano (Bila; Dezotti, 2007; Filho; Vieira, 2006; Gea; Toso; Schilirò, 2020).

Os ensaios não instrumentais são divididos em imunoensaios (ELISA e RIA) e bioensaios (YES e E-Screen). Os imunoensaios são técnicas bioquímicas que permitem o cálculo da concentração dos estrógenos por espectrofotometria. Os bioensaios são técnicas que envolvem ensaios *in vitro* ou *in vivo*, se baseiam na ligação de EEs nos receptores de estrogênio, o que gera uma resposta e produz informações quantitativas sobre a atividade estrogênica da amostra (Fang *et al.*, 2016).

As técnicas instrumentais e os imunoensaios são amplamente utilizados para quantificar as concentrações de EEs específicos, mas apresentam a limitação de não preverem a atividade estrogênica influenciada por esses compostos. Por outro lado, os bioensaios não quantificam compostos separadamente, mas são adequados para avaliar o efeito de misturas, pois abrangem as interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas e os efeitos de compostos desconhecidos ou não considerados em análises instrumentais (Fang *et al.*, 2016; Gea; Toso; Schilirò, 2020).

4.4 Legislação

Apesar dos riscos iminentes, a legislação referente aos DE ainda é insuficiente para minimizar o lançamento desses compostos nos corpos d'água. As regiões que se destacam com

maiores estruturas regulatórias são a América do Norte e a Europa. Japão, China e países da Ásia se sobressaem em comparação aos demais países (Barton-Maclaren *et al.*, 2022; EPA, 2023; EU, 2006). A abordagem regulamentar atual é baseada, geralmente, nos perigos, riscos e exposição, com autorizações e restrições aplicadas a setores específicos, como defensivos agrícolas, cosméticos, dispositivos de uso médico e água para consumo humano. De forma geral, a atuação para limitar a exposição humana aos DE é lenta e insuficiente, são necessárias colaboração, investigação e modernização contínuas para traduzirem as inovações da ciência em abordagens de limitações práticas e confiáveis, e que incluem questões críticas, como misturas e os potenciais impactos das exposições cumulativas (Barton-Maclaren *et al.*, 2022; Kassotis *et al.*, 2020).

4.5 Remoção de estrogênios ambientais e toxicidade em reator UASB

Processos anaeróbios de tratamento de esgoto envolvem a atividade conjunta de diversos microrganismos na transformação de material orgânico em dióxido de carbono, metano e biomassa. A degradação anaeróbia da matéria orgânica pode ser dividida em quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Cada estágio é realizado por diferentes grupos de microrganismos que requerem condições ambientais distintas e operam em taxas de conversão diferentes (Lier, Mahmoud e Zeeman, 2020).

A remoção de EEs em processos anaeróbios é influenciada por diversos fatores, como, por exemplo, a estrutura química dos compostos, sua concentração inicial, a carga orgânica aplicada e os parâmetros operacionais, como temperatura e tempo de retenção do lodo e do efluente (Manetti; Tomei, 2024). Ao comparar o desempenho do reator UASB com duas formas diferentes de operação, Louros *et al.* (2021) registraram remoção de E1 e EE2 acima de 95% no tratamento com fluxo intermitente e variando de 39% a 49% em fluxo contínuo, ambos com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 30 h. Os autores apontaram a biodegradação como principal mecanismo de remoção para E1 e adsorção no lodo para EE2. As maiores remoções dos poluentes no reator de fluxo intermitente foram atribuídas ao período sem alimentação, o que promoveu a adaptação da população microbiana à biodegradação dos estrogênios. O tempo de retenção do efluente também pode ser um fator importante na remoção de EEs, em um tratamento de fluxo contínuo com um TDH de 8 h, a média de remoção de EE2 foi inferior a 13% (Rodrigues-Silva *et al.*, 2022) e com um TDH de 7 h, -25% (Vassalle *et al.*, 2020).

Os processos anaeróbios dificilmente produzem efluentes capazes de atender aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental, com eficiência de remoção de DBO e DQO em torno de 55 a 70% (Lutterbeck *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2023; Vassalle *et al.*, 2020). Outros

estudos demonstraram que embora o tratamento anaeróbio tenha sido capaz de reduzir parâmetros como DBO, DQO e sólidos suspensos aos limites legais, o tratamento não removeu toxicidade e produziu efluentes extremamente tóxicos ao microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e larvas do peixe *Danio rerio* (Düpont; Lobo, 2012; Silva *et al.*, 2021).

Além disso, Vassalle *et al.* (2020) indicaram que os reatores UASB são ineficientes na remoção de cinco dos seis compostos estrogênicos investigados e Brandt *et al.* (2013) verificaram aumento da concentração dos xenoestrogênios nonifenol e bisfenol A no efluente tratado. Após o tratamento pelo reator UASB, a concentração de nonilfenol no efluente pode aumentar devido à degradação de alquilfenol polietoxilado (Queiroz *et al.*, 2012). De forma similar, durante o tratamento biológico, o hormônio estrona pode ser produzido pela oxidação do 17 β -estradiol e pela desconjugação parcial de estrona-3-glucoronídeo e estrona-3-sulfato (D'ascenzo *et al.*, 2003).

4.6 Sistemas UASB-microalgas-bactérias na redução de toxicidade e micropoluentes

O tratamento de esgotos sanitários por meio de consórcio microalgas-bactérias é uma tendência crescente, pois permite a remoção de nutrientes e, simultaneamente, a produção de biomassa com potencial energético, fertilizante, dentre outros produtos de valor agregado. Matamoros *et al.* (2015) sugeriram que a biodegradação e a fotodegradação são os caminhos mais importantes na remoção de micropoluentes em lagoas de alta taxa (LATs) que recebem esgoto urbano previamente tratado. O sistema alcançou eficiência variável de remoção, dependendo do contaminante avaliado. A média de remoção de xenoestrogênio bisfenol A foi de 85% e a toxicidade aguda ao microcrustáceo *Daphnia magna* no efluente final foi removida.

Vassalle *et al.* (2020) avaliaram a capacidade de um sistema UASB seguido de LATs na remoção de onze micropoluentes orgânicos presentes no esgoto urbano, incluindo fármacos, estrogênios e xenoestrogênios. O sistema foi altamente eficiente na remoção da maioria dos compostos, com taxas de remoção variando de 65 a 95%, sendo que apenas dois compostos (gemfibrozil e bisfenol A) tiveram remoções abaixo de 43%. Os autores concluíram que novas pesquisas são necessárias para otimizar os parâmetros operacionais e eventualmente aumentar a remoção dos contaminantes.

Hena, Gutierrez e Croué (2021) em revisão sobre a remoção de fármacos e produtos de cuidados pessoais por diversas microalgas destacaram a viabilidade das microalgas e consórcios de microalgas/bactérias na remoção de micropoluentes de efluentes de ETEs em diversas técnicas de tratamento. O estudo ressaltou possíveis efeitos tóxicos dos compostos sobre a cultura; no entanto, a aclimação e técnicas de culturas híbridas são capazes de reduzir o efeito

tóxico e aumentar a eficiência de remoção dos micropoluentes. Os autores apontaram as microalgas como uma abordagem promissora e sustentável para biotransformação eficiente de micropoluentes.

4.7 Revisão bibliométrica: remoção de estrogênios ambientais por microalgas e consórcio de microalgas

Foi realizada uma revisão integrativa da literatura, a fim de reunir e analisar criticamente estudos experimentais publicados sobre a remoção de estrogênios ambientais por microalgas ou consórcios microalgas-bactérias em sistemas aquosos. A busca foi conduzida em março de 2025, utilizando as bases de dados *Scopus* e *Web of Science (WoS)*, que abrangem ampla cobertura científica e técnica nas áreas de engenharia ambiental, biotecnologia e ciências ambientais.

Os termos de busca aplicados foram: “*xenoestrogen*” OR “*estrogen*” OR “*estrogenic*” AND “*algal-bacterial consortium*” OR “*photobiorreactor*” OR “*high-rate algal ponds*” OR “*raceway pond*”. Foram adotados como critérios de inclusão: (i) artigos originais de pesquisa com processo de tratamento realizado em meio aquoso; (ii) estudos que avaliaram a remoção de ao menos um composto estrogênico ambiental; (iii) uso de microalgas isoladas ou consórcios com microalgas como agentes do tratamento; (iv) publicações em inglês com texto completo acessível. Foram excluídos artigos de revisão, artigos duplicados e estudos que não se enquadravam nos critérios acima.

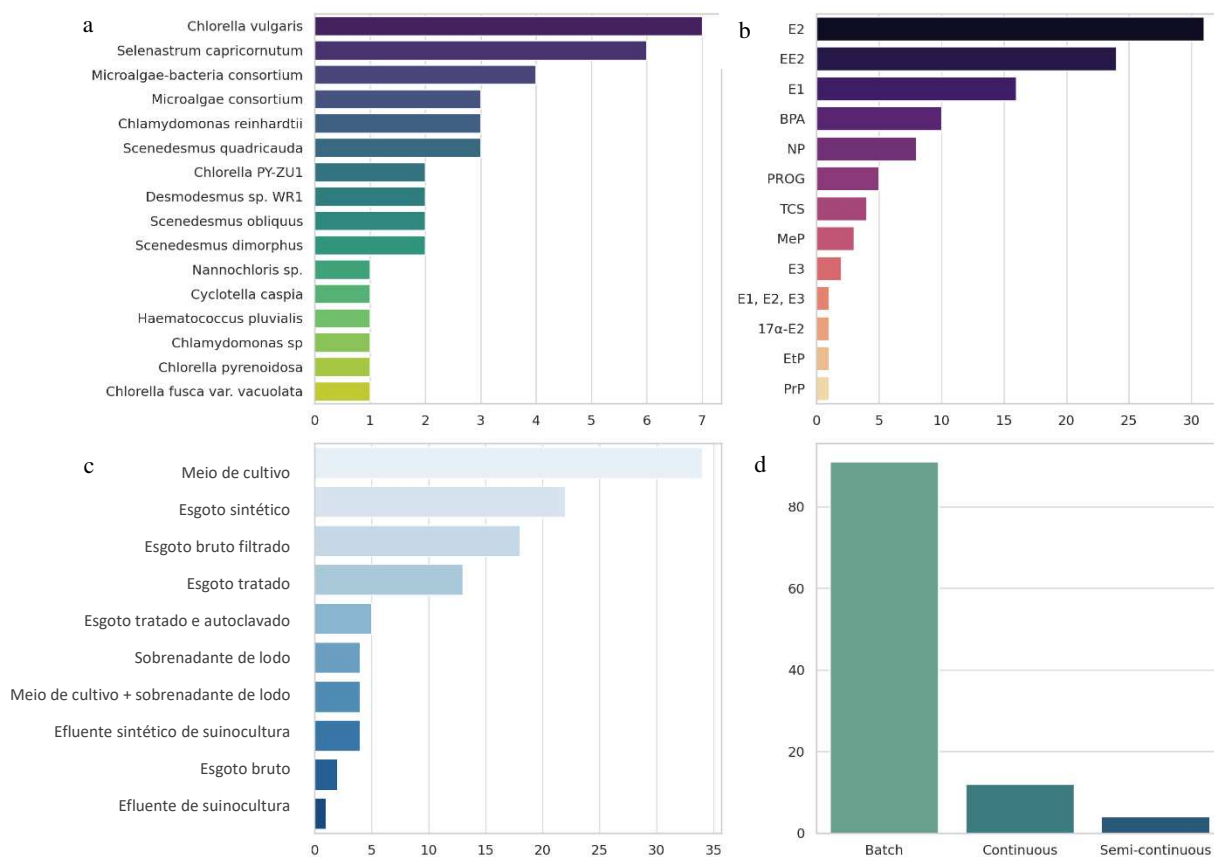
A triagem dos artigos foi conduzida por meio da ferramenta StArt (*State of the Art through Systematic Review*), desenvolvida pelo LaPES/UFSCar. A busca inicial resultou em 554 artigos, sendo 176 da base *Scopus* (1995–2025) e 378 da *WoS* (1960–2025). Após a exclusão de duplicatas, restaram 267 documentos. A leitura dos títulos e resumos resultou na seleção final de 24 artigos, publicados entre 2002 e 2025, provenientes de 12 países (Figura 3). Destacam-se a China (n=9), EUA e Espanha (n=3 cada), e os demais países com uma publicação cada (Brasil, Índia, Japão, México, Países Baixos, Portugal, Reino Unido, Tailândia e Taiwan).

Após a seleção final dos 24 artigos incluídos na revisão, foi realizada a extração sistemática das informações relevantes utilizando uma planilha padronizada, elaborada com base nos objetivos do estudo. Para cada artigo, foram coletadas as seguintes informações: autores e ano de publicação, país de origem da pesquisa, espécie de microalga ou consórcio utilizados, estrogênio ambiental investigado, eficiência de remoção do composto estrogênico, eficiência de remoção da atividade estrogênica, concentrações iniciais e finais de EEs,

4.7.1 Discussão dos resultados bibliométricos

A maioria das publicações concentrou-se nos últimos 10 anos, evidenciando o avanço recente das tecnologias sustentáveis de tratamento de efluentes. Em relação às microalgas empregadas, observou-se maior frequência de experimentos com *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus capricornutum*. A Figura 4a apresenta as frequências de aplicações das microalgas nos estudos avaliados. Quanto aos compostos estrogênicos investigados, os mais recorrentes foram E2, EE2, E1 e bisfenol A (BPA) (Figura 4b).

Figura 4 – Frequência de estudos com microalgas na remoção de EEs. (a) frequência de aplicação de microalgas nos estudos avaliados, (b) frequência de aplicação de EEs, (c) frequência de uso dos meios aquosos, (d) frequência dos modos de operação.



Fonte: elaboração própria

Em relação ao meio aquoso utilizado nos estudos, destaca-se a diversidade de matrizes empregadas, incluindo esgotos tratados, sintéticos e industriais (Figura 4c). Essa diversidade é

importante para testar a aplicabilidade dos sistemas em diferentes contextos, mas também pode dificultar comparações diretas de eficiência entre estudos.

Reatores em batelada, típicos em estudos de laboratório, foram o modo de operação mais comum (Figura 4d). O modo contínuo foi empregado em menor escala, geralmente associado a configurações de reatores mais complexas ou a estudos em escala piloto. Esse padrão reforça a necessidade de avanços experimentais em direção a sistemas contínuos, mais próximos da realidade operacional em estações de tratamento. Os estudos em escala de bancada contêm incertezas que limitam a extrapolação dos resultados para escalonamento. A escassez de estudos em escala piloto ou real, com monitoramento de longo prazo e avaliação econômica, constitui uma lacuna significativa e um caminho promissor para pesquisas futuras.

Na Tabela 1 estão apresentados os resumos dos artigos selecionados com as espécies de microalgas ou consórcios utilizados, a densidade microalgal, o meio aquoso, o composto estrogênico, as eficiências de remoção e os principais mecanismos de remoção relatados pelos autores.

Tabela 1 - Resumo dos artigos publicados até março de 2025 nas bases *Scopus* e *WoS* sobre o uso de microalgas para a remoção de EEs e/ou atividade estrogênica em sistemas aquosos.

Microrganismo	Densidade microalgal	Meio aquoso	Composto estrogênico	Eficiência de remoção	Mecanismo de remoção	Referência
<i>Nannochloris sp.</i>	2×10^5 cel.mL ⁻¹	Efluente ETE após ozonização e ultrafiltração, autoclavados e enriquecidos	E1 E2 EE2 BPA TCS	Efluente ozonização: Remoção não significativa Efluente ultrafiltração: E1: 29% E2: 60% EE2: 60% BPA: 46% TCS: 100%	Fotodegradação e biodegradação	(Bai; Acharya, 2019)
Consórcio microalgas-bactérias (predominantes: <i>Chlorella sp.</i> , <i>Merismopedia sp.</i> , <i>Closteriopsis sp.</i> , <i>Scenedesmus sp.</i>)	30% v/v	BG11 esterilizado e enriquecido	E2 TCS	E2: 75,5 e 91,73% TCS: 78,4%	Biodegradação	(Bano; Malik; Ahammad, 2021)
<i>Chlorella PY-ZU1</i> obtida por mutagênese de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> por radiação gama cobalto 60	400 mg. L ⁻¹	Efluente sintético: solução de Brostol esterilizada	EE2	88 a 94%	Fotodegradação, absorção física e biodegradação	(Cheng, Jun <i>et al.</i> , 2018)
<i>Selenastrum capricornutum</i> e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	100 mg.L ⁻¹ de peso seco	BG11: <i>S. capricornutum</i> P 49: <i>C. reinhardtii</i>	E2 EE2	<i>S. capricornutum</i> : E2: 88% e 100% EE2: 60% e 95% <i>C. reinhardtii</i> E2: 100% EE2: 100% e 76%	Biodegradação (42 e 54%) e adsorção na biomassa	(Hom-Diaz <i>et al.</i> , 2015)

<i>Chlorella vulgaris</i>	0,8, 1,5 e 2,3 g.L ⁻¹ peso seco	Meio Jaworski	E1 E2 E3 EE2 Hidroxiestrona	E2: 85% E1: 14% E3 e EE2: ligeira queda, remoção não conclusiva Hidroxiestrona: não removido	-	(Lai; Scrimshaw; Lester, 2002)
<i>Cyclotella caspia</i>	-	-	Nonilfenol (NP)	0,14 mg.L ⁻¹ = 37,7% 0,18 mg.L ⁻¹ = 31,7% 0,22 mg.L ⁻¹ = 6,5%	Degradação física e biodegradação	(Liu, Yu; Dai; Wei, 2013)
<i>Selenastrum capricornutum, Scenedesmus quadricauda e Chlorella vulgaris</i>	3 x 10 ⁷ cel.mL ⁻¹	Meio BG11	E2 EE2	<i>S. capricornutum</i> : E2 - 91% e EE2 - 83% <i>S. quadricauda</i> : E2 - 73% e EE2 - 57% <i>C. vulgaris</i> : E2 - 92% e EE2 - 55%	Biotransformação e degradação fotocatalítica mediada por matéria orgânica algal extracelular	(Wu et al., 2021)
<i>Chlorella vulgaris</i>	1 x 10 ⁶ cel.mL	Efluente sintético	Metilparabeno (MP)	0,796 mg.L ⁻¹ : 33,16% 7,96 mg.L ⁻¹ : 14,10%	Biodegradação e fotodegradação	(Vale et al., 2022)
<i>Desmodesmus sp.WR1</i>	2,4 x 10 ⁵ 4,8 x 10 ⁵ 9,6 x 10 ⁵ 1,9 x 10 ⁶ cel.mL ⁻¹	Esgoto doméstico bruto filtrado em várias camadas de gaze	E2	85 a 99%	Biotransformação e biodegradação	(Wang, Rui et al., 2020)
Consórcio <i>Chlorella vulgaris</i> foi predominante, <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Westella botryoides</i> e diferentes espécies de diatomáceas	-	Esgoto sanitário tratado por reator UASB	E1 E2 EE2 E3 NP BPA	E1: 55% E2: 7% EE2: 70% E3: 45% NP: 70% BPA: 44%	Hormônios: sorção e biodegradação	(Vassalle et al., 2020)

<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	Aprox. 9,9 x 10 ⁸ células	Efluente sintético	E1 E2 EE2	H. pluvialis E1: 97% 10 dias E2: 100% 10 dias EE2: 85% 20 dias S. capricornutum E1: 80% 10 dias E2: 100% 10 dias EE2: 26% 20 dias S. quadricauda E1: 97% 10 dias E2: 100% 10 dias EE2: 85% 20 dias C. vulgaris E1: -9% 10 dias E2: 100% 10 dias EE2: -18% 20 dias	Biodegradação	(Wang, Yuwen <i>et al.</i> , 2019b)
Consórcio alga-bactéria	-	Porção líquida de esterco animal (suíno)	E1, E2, E3	89,8 ± 1,1%	Sorção e biodegradação	(Shin <i>et al.</i> , 2019)
<i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus obliquus</i>	100 mg.L ⁻¹ de biomassa seca	Efluente sintético suíno	E1 E2	<i>S. obliquus</i> E1: 91% E2: 99% <i>C. vulgaris</i> E1: 52% E2: 99%,	Biodegradação e sorção	(Ruksrithong; Phattarapattamawong, 2019)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	40 mg.L ⁻¹	Meio Bold 3N modificado (MB3N)	17 α -E2, E1 E2 E3	17 α -E2: 85% E1: 85% E2: 95% E3: 95%	Biotransformação	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)

<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Chlorella</i> sp.(2f5aia),, <i>Chlorella</i> sp. (1uoai).	70 mg.L ⁻¹ de biomassa seca	Meio de cultivo BM ou SE	E2 EE2 E2 + EE2	<i>Chlorella vulgaris</i> E2: 99,1 e 99,8% EE2: 0,7% e 3%	Biotransformação	(Wang, Ping; Wong; Tam, 2017)
				<i>Selenastrum capricornutum</i> E2: 86,8% e 93,9% EE2: 47,2% e 75,3%		
				<i>Scenedesmus quadricauda</i> E2: 71,6% e 82,6% EE2: 37,5% e 66,8%		
				<i>Chlamydomonas</i> sp. E2: 84,9 e 72,6% EE2: 70,4% e 83,0%		
				<i>Chlorella</i> sp.(2f5aia) E2: 99,0 e 97,2% EE2: 63,7% e 54,4%		
				<i>Chlorella</i> sp. (1uoai) E2: 99,3 e 99,4% EE2: 50,0% e 64,0%		
Mistura de <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Chlorococcus</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , e <i>Anaebena var</i>	100 mg.L ⁻¹	Efluente sintético simulando lagoa anaeróbia	E1 E2 EE2	Batelada: E1: 52% E2: 54% EE2: 56% Fluxo contínuo: E1: 83,9% E2: aprox. 90% EE2: aprox. 86%	Biodegradação e sorção	(Shi <i>et al.</i> , 2010)

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	0,05 mg.L ⁻¹ de clorofila	Esgoto sanitário bruto filtrado em membrana de 0,22 µm	NP BPA E1 Progesterona (PROG)	<i>C. reinhardtii</i>	-	(Zhou <i>et al.</i> , 2014)
				Nonilfenol: -54,0%		
				Bisfenol-A: 98,6%		
				Estrona: 84,5%		
<i>S. obliquus</i>	Progesterona: 83,5%					
<i>C. pyrenoidosa</i>	Nonilfenol: -31,5%					
Nonilfenol: 5,0%	Bisfenol-A: 99,1%					
Bisfenol-A: 98,9%	Estrona: 87,6%					
Estrona: 87,2%	Progesterona: 84,3%					
Progesterona: 83,5%						
<i>C. vulgaris</i>	Nonilfenol: -51,2%					
Nonilfenol: -51,2%	Bisfenol-A: 99,0%					
Bisfenol-A: 99,0%	Estrona: 86,6%					
Estrona: 86,6%	Progesterona: 86,9%					
Progesterona: 86,9%						
<i>Chlorella fusca var. vacuolata</i>	-	Meio Bristol modificado	BPA	Luz contínua (18 W/m ²): entre 10 e 80 µM: > 95% 160 µM: 70% Luz contínua (0 a 36 W/m ²): 36 W/m ² = 98% 2 W/m ² = 82% 0 W/m ² = 27% Fotoperíodo: 8 h luz a 18 W/m ² : 90%	Biodegradação	(Hirooka <i>et al.</i> , 2005)

<i>Chlorella</i> PY-ZU1 (mutagênese de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> por radiação gama cobalto 60)	-	Efluente sintético	EE2	86%	-	(Ye <i>et al.</i> , 2018)
Consórcio domínio de <i>Chlorella</i> , e <i>Pseudosporangiococcum</i> em menor abundância	-	Efluente de banheiros	E2	Fotobiorreator piloto (PBR): 55 a 100% Fotobiorreator bancada (E): 99 a 100%	PBR: sorção, biodegradação, fotodegradação e volatilização E: biodegradação e sorção	(Parladé <i>et al.</i> , 2018)
<i>Desmodesmus</i> sp. WR1	Aprox. 10 ⁶ cel.mL ⁻¹ + 6, 30 e 50 mg.L ⁻¹ de Mn ²⁺	Meio BG11	BPA	30 mg.L ⁻¹ Mn ²⁺ : 78% Demais: aprox. 60%	Glicosilação (Degradação)	(Wang, Rui <i>et al.</i> , 2017)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	70 mg.L ⁻¹	Esgoto primário sedimentado	E2 EE2	Ciclo 1 E2: 99,9% / EE2: 79,1% Ciclo 2 E2: 99,7% / EE2: 96,2% Ciclo 3 E2: 99,9% / EE2: 98,4% Ciclo 4 E2: 100% / EE2: 99%	E2: biodegradação por microrganismos EE2: biodegradação por microalga	(Wang, Ping; Luan; Luo, 2023)
Consórcio microalgas-bactérias (dominantes: <i>Desmodesmus</i> e <i>Scenedesmus</i>)		Esgoto bruto pré-tratado	E1	Verão: E1: 27,3% Progesterona: 100% Metilparabeno: 68,3% Etilparabeno: -21% Propilparabeno (PrP): 63,3%	Biosorção	(Gonzalo Ibrahim <i>et al.</i> , 2025)
Consórcio de microalgas	300 e 500 mg.L ⁻¹	Efluente sintético	BPA TCS	300 mg.L ⁻¹ BPA: 95,1% / TCS: 61,1% 500 mg.L ⁻¹ BPA: 95,7% / TCS: 86,2%	BPA: biodegradação TCS: fotodegradação	(Atengueño-Reyes <i>et al.</i> , 2024)

4.7.2 Principais mecanismos de remoção

Os principais mecanismos de remoção de EEs apresentados nos artigos avaliados incluem os processos de sorção, bioacumulação, biodegradação, biotransformação e a mediação de degradação fotocatalítica pela matéria orgânica extracelular de microalgas (Hirooka et al., 2005; Wang et al., 2019; Wu et al., 2021). As células das microalgas possuem grande área superficial que promove adsorção de compostos. Após a adsorção, os EEs são facilmente absorvidos pelas células, pois são, em sua maioria lipofílicos, e podem penetrar facilmente na membrana celular de microalgas. No interior das células, os EEs são biodegradados ou biotransformados (Ma *et al.*, 2022).

A sorção é um processo passivo no qual moléculas solúveis são distribuídas entre a fase líquida e a parede celular, ou entre a matéria orgânica extracelular (MOE) das microalgas. Envolve mecanismos físico-químicos, como adsorção (o contaminante permanece na superfície da célula) e absorção (o contaminante entra na célula microalgal, o que só é possível em biomassa viva) (Atengueño-Reyes *et al.*, 2024). A adsorção de EEs depende da sua estrutura, hidrofobicidade, a presença de grupos funcionais, a espécie de microalga e de fatores ambientais como pH, temperatura e tempo de contato. A parede celular e a MOE das microalgas geralmente carregam cargas negativas devido à presença de grupos funcionais carboxilo, hidroxilo e fosforilo, que favorecem interações eletrostáticas com as moléculas carregadas positivamente (Hena, Gutierrez e Croué, 2021).

Esses fatores que influenciam a sorção foram observados para o composto lipofílico triclosan, que se associou às células imediatamente após a adição de microalgas e sua adsorção aumentou com o aumento da concentração de microalgas (Bai; Acharya, 2019). Para o bisfenol-A, observou-se comportamento distinto: com o aumento de concentração de microalgas, a adsorção diminuiu, mas essa diminuição refletiu-se em aumento da biodegradação, o que sugere uma tendência do BPA à degradação biológica (Atengueño-Reyes *et al.*, 2024).

A absorção é a captação de contaminantes para o interior das células das microalgas e envolve a transferência dessas moléculas através da membrana celular (Gonzalo Ibrahim *et al.*, 2025; Vale *et al.*, 2022). A bioacumulação é um processo ativo que consome energia e é relativamente mais lento do que o processo de adsorção. Juntamente com os nutrientes, as microalgas podem absorver e acumular poluentes dentro da célula para processos de crescimento. MOE e a parede celular atuam como barreiras de primeira linha. Numerosas microalgas podem acumular poluentes contra a diferença de gradiente de concentração entre o citoplasma e o ambiente externo (Hena; Gutierrez; Croué, 2021). Para bioacumular dentro da

célula, as moléculas devem primeiro cumprir os critérios-chave necessários para a bioadsorção. No entanto, nem todos os poluentes adsorvidos na superfície das microalgas podem entrar na célula. A probabilidade e a extensão da bioacumulação são fortemente influenciadas pelas propriedades físico-químicas do composto, sendo a hidrofobicidade uma das mais relevantes. Compostos com um coeficiente de partição octanol-água mais alto tendem a bioacumular mais facilmente nas células microalgais devido à natureza lipídica das membranas celulares (Atengueño-Reyes *et al.*, 2024; Vale *et al.*, 2022).

A biodegradação é uma degradação metabólica ou quebra de compostos catalisada por enzimas. Geralmente, as microalgas transformam compostos complexos em compostos mais simples. As microalgas biodegradam compostos xenobióticos por meio de uma série de enzimas em um processo de três fases. A primeira fase envolve processos de oxidação, redução ou hidrólise. Durante esta fase, os compostos lipofílicos são transformados em compostos hidrofílicos por meio da incorporação de grupos hidroxilo. Na segunda fase, os compostos com grupos eletrofílicos formam uma ligação conjugada com glutatona. A terceira fase envolve várias enzimas para biotransformar os compostos xenobióticos em formas mais simples (Bano; Malik; Ahammad, 2021; Hena; Gutierrez; Croué, 2021; Wang, Ping; Wong; Tam, 2017).

A biodegradação foi considerada o mecanismo mais importante para remoção de BPA, com até 40% de remoção, independente da densidade celular inicial do consórcio microalgas-bactérias (Atengueño-Reyes *et al.*, 2024), enquanto *Chlorella fusca* removeu mais de 90% do BPA por biodegradação no estudo de Hirooka *et al.* (2005). As taxas de biodegradação podem variar de acordo com a concentração inicial do poluente. Em geral, quando a concentração do EEs é muito alta a biodegradação é menor, pois o composto pode causar efeito tóxico nas microalgas. Após oito dias de tratamento com *Cyclotella caspia*, Liu, Dai e Wei (2013) registraram biodegradação de 37,7, 31,7 e 6,5% para concentrações iniciais de 0,14, 0,18 e 0,22 mg.L⁻¹ de nonilfenol (NP). Vale *et al.* (2022) avaliaram a remoção de metilparabeno (MP) com concentrações iniciais de 0,776 e 7,96 mg.L⁻¹ e registraram remoções de 33,16 e 14,10% com *Chlorella vulgaris*.

A biotransformação está intimamente relacionada com a biodegradação e refere-se à modificação da estrutura química de um composto por organismos vivos, o que pode levar à depuração ou à formação de produtos que podem ser ainda mais metabolizados (Wang, Ping; Wong; Tam, 2017). As microalgas podem biotransformar compostos estrogênicos rapidamente. Por exemplo, tanto o 17 α -estradiol (17 α -E2) quanto o E2 podem ser biotransformados em E1 por microalgas, que pode então ser transformada em E3 via hidroxilação e degradada em outros

compostos desconhecidos (Bano; Malik; Ahammad, 2021; Wang, Ping; Wong; Tam, 2017; Wang, Rui *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2014). A adsorção de E1 e E2 pode ocorrer nos primeiros 30 minutos do tratamento e, no processo de biotransformação, E2 pode ser facilmente transformado em E1 (Ruksrithong; Phattarapattamawong, 2019). As microalgas também são capazes de converter E3 em E2, mas a interconversão dominante é E2 – E1 (Lai; Scrimshaw; Lester, 2002).

Alguns EEs degradam-se sob irradiação da luz. Existem dois tipos de fotodegradação (ou fotólise) envolvidos na degradação de EEs em águas residuárias: fotodegradação direta e indireta. Durante a fotodegradação direta, as moléculas de poluentes podem absorver diretamente a irradiação da luz na faixa UV e, eventualmente, se degradar sem qualquer envolvimento de microalgas (Hena; Gutierrez; Croué, 2021). A fotólise indireta ocorre com a geração de radicais livres produzidos durante a irradiação com luz. Esses radicais livres são formados na presença de matéria orgânica dissolvida, como ácidos húmicos e fúlvicos, nitratos e alguns íons metálicos. Durante a irradiação, células de microalgas também podem ser gradualmente degradadas com liberação de ácido carboxílico, o ácido carboxílico forma outra espécie reativa de oxigênio, que participa na fotólise de compostos recalcitrantes no meio (Hena; Gutierrez; Croué, 2021).

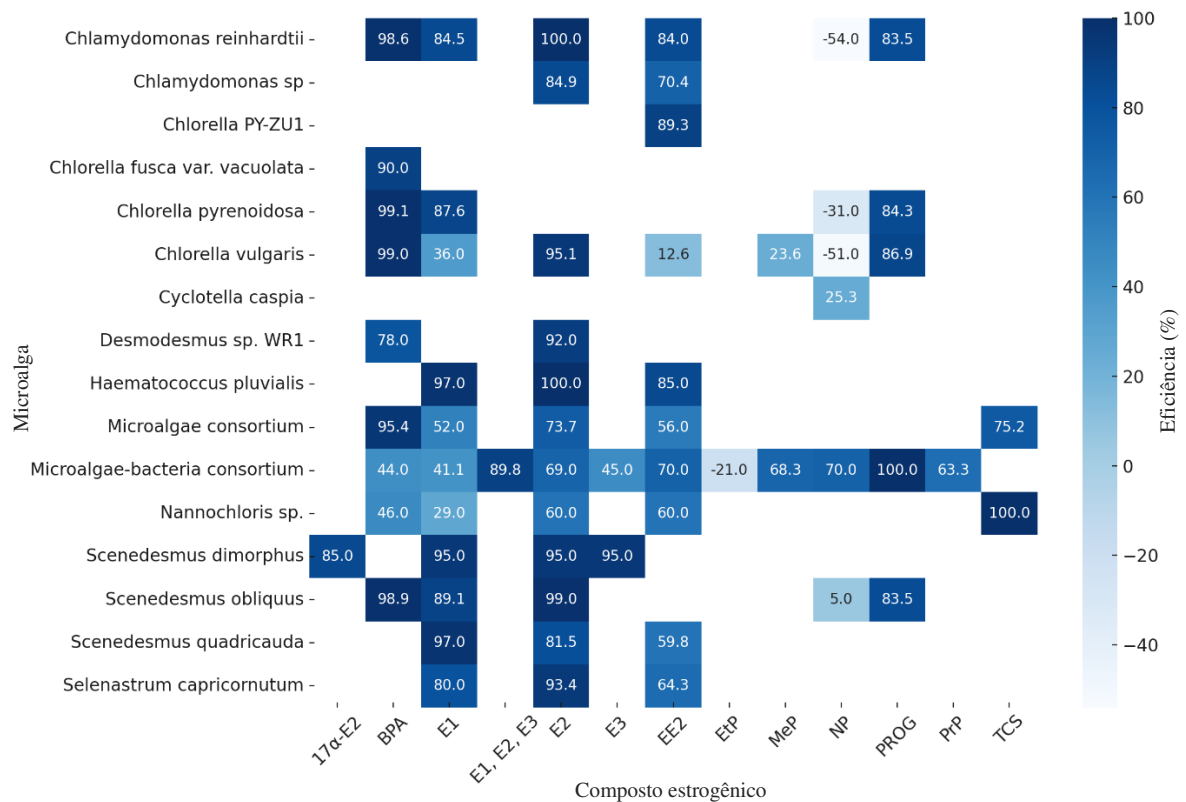
No estudo de Atengueno-Reyes *et al.* (2024), a fotólise indireta resultou em remoções de 26,2% e 14,1% para BPA e triclosan (TCS), respectivamente. A presença de nitrato demonstrou melhorar a degradação do BPA via fotólise indireta. Nos experimentos de Wu *et al.* (2021), MOE de *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella vulgaris* alcançaram 100% de remoção de E2 e EE2 sob irradiação de luz visível. A MOE das três espécies de microalgas testadas (*Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella vulgaris*) mostrou redução significativa de E2 e EE2 sob luz visível, sem formação detectável de E1. A espectroscopia de matriz de excitação-emissão de fluorescência identificou substâncias semelhantes a húmicos/fúlvicos na MOE das três culturas de microalgas, as quais podem ser responsáveis por induzir a fotólise indireta de E2 e EE2, pois se sabe que os ácidos húmicos e fúlvicos são fotossensibilizantes em águas superficiais.

4.7.3 Eficiência de remoção de estrogênios ambientais

Os dados dos gráficos apresentados nessa seção estão no Apêndice (Tabela S1) dessa tese. As eficiências médias de remoção de EEs por diferentes espécies e consórcios de microalgas são apresentadas na Figura 4, e as eficiências médias de remoção em relação ao tempo de tratamento são apresentadas na Figura 5. Na Figura 4, a eficiência de remoção varia

consideravelmente entre as diferentes combinações de microalgas e EEs. Este gráfico é particularmente útil para identificar a melhor microalga para cada EE. Em geral, os consórcios e a maioria das microalgas demonstraram remoções positivas dos estrogênios avaliados.

Figura 4 – Mapa de calor da eficiência de remoção de EEs (%) por espécie de microalgas. A escala de cores em azul representa a porcentagem de remoção, os tons mais escuros indicam maior eficiência.

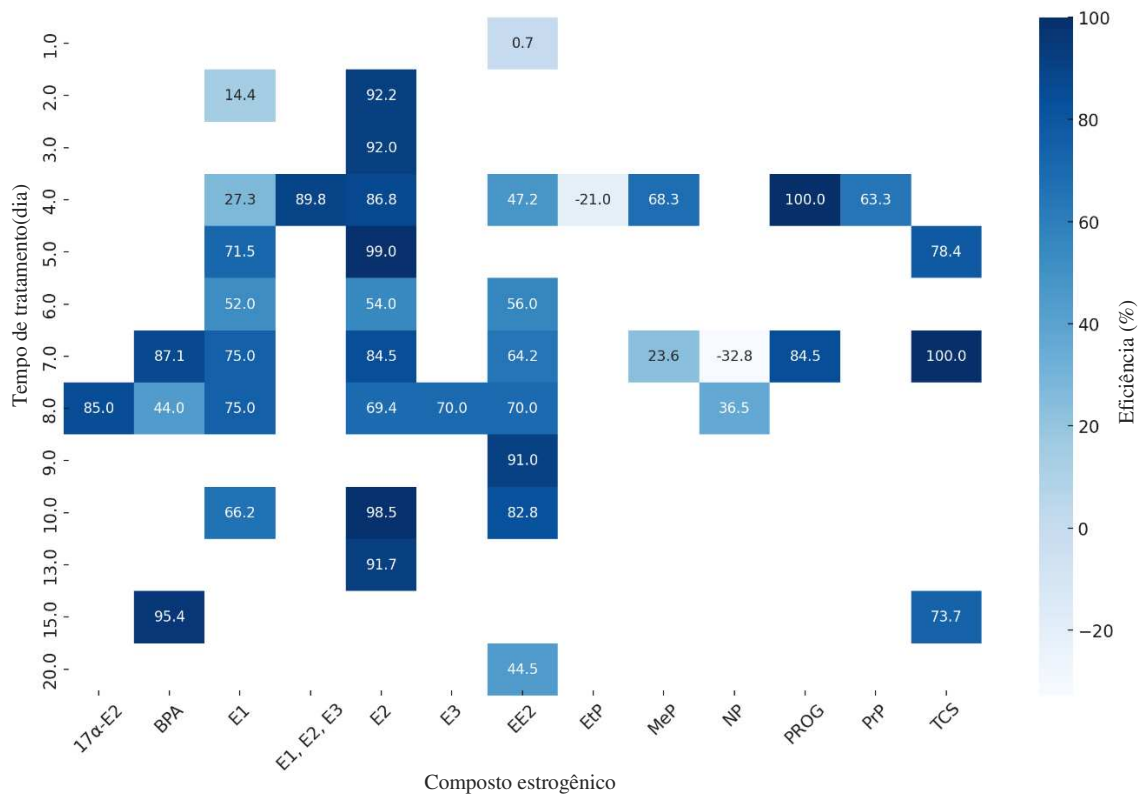


Fonte: elaboração própria

A microalga *C. vulgaris* apresentou alta eficiência de remoção para E2, progesterona (PROG) e BPA. As microalgas *S. obliquus* e *C. reinhardtii* também demonstram alta capacidade de remoção para até cinco compostos, assim como os diversos consórcios avaliados, com destaque para a remoção superior a 70% de NP pelo consórcio microalgas-bactérias. A seleção da microalga adequada é crucial para garantir a eficiência na remoção de EEs específicos. A combinação de diferentes microalgas pode ser uma estratégia promissora para o tratamento de águas contaminadas com múltiplos EEs. É importante ressaltar que este mapa de calor representa apenas um conjunto de dados e que outros fatores, como as condições de cultivo das microalgas e a concentração dos estrógenos, podem influenciar na eficiência de remoção.

O mapa de calor na Figura 5 destaca o impacto do tempo de tratamento na eficiência de remoção e indica que vários compostos apresentam alta eficiência de remoção em tempos de tratamento específicos. Por exemplo, E1 apresenta uma eficiência de remoção de 14% em 2 dias de tratamento, que aumenta para 52% em 6 dias e 75% em 7 dias. Essa tendência destaca a importância de otimizar as condições operacionais para maximizar a eficiência de remoção.

Figura 5 – Mapa de calor da eficiência média de remoção (%) de EEs em relação ao tempo de tratamento (dia) dos artigos analisados. A escala de cores em azul representa a porcentagem de remoção, sendo que tons mais escuros indicam maior eficiência.

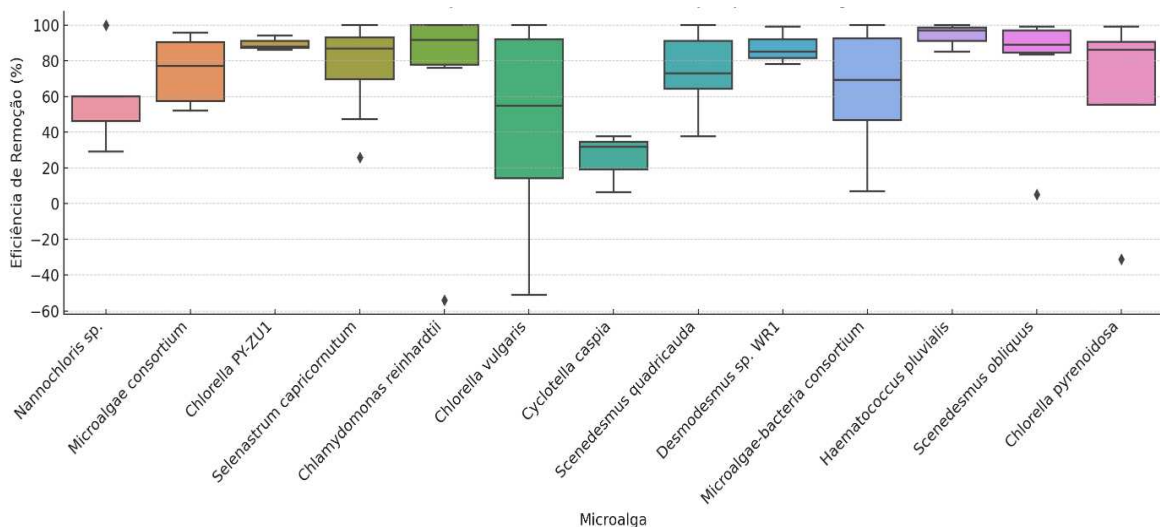


Fonte: elaboração própria

Alguns estrógenos, como 17α-E2, etilparabeno (EtP) e propilparabeno (PrP), têm pontos de dados limitados, o que dificulta a obtenção de conclusões definitivas sobre seu comportamento. NP mostra uma eficiência de remoção negativa em um tempo de tratamento de 7 dias com diferentes espécies de microalgas, o que não ocorre com o uso de consórcio de microalgas-bactérias (Figura 4). No geral, o mapa de calor destaca a importância da otimização do tempo de tratamento do meio aquoso para maximizar a eficiência de remoção e identifica EEs específicos que podem exigir investigação adicional ou diferentes estratégias de tratamento.

A Figura 6 apresenta diagramas de caixa (*boxplots*) que resumem a distribuição das eficiências de remoção reportados para cada espécie de microalga em diferentes estudos e para diferentes EEs. Para cada espécie de microalga, há uma variabilidade na eficiência de remoção reportada, como indicado pela altura das caixas e pelos *whiskers*. Isso reflete a influência de diferentes fatores experimentais (concentração do poluente, tempo de tratamento, condições de cultivo etc.) e da capacidade de cada uma em remover diferentes EEs. Algumas microalgas, como *Chlorella PY-ZUI* e o consórcio de microalgas, tendem a apresentar medianas de eficiência de remoção mais altas em comparação com outras, como *Nannochloris sp.* e *Chlorella caspia*. A presença de *outliers* indica casos de eficiência de remoção particularmente alta ou baixa para determinadas espécies de microalgas em condições específicas.

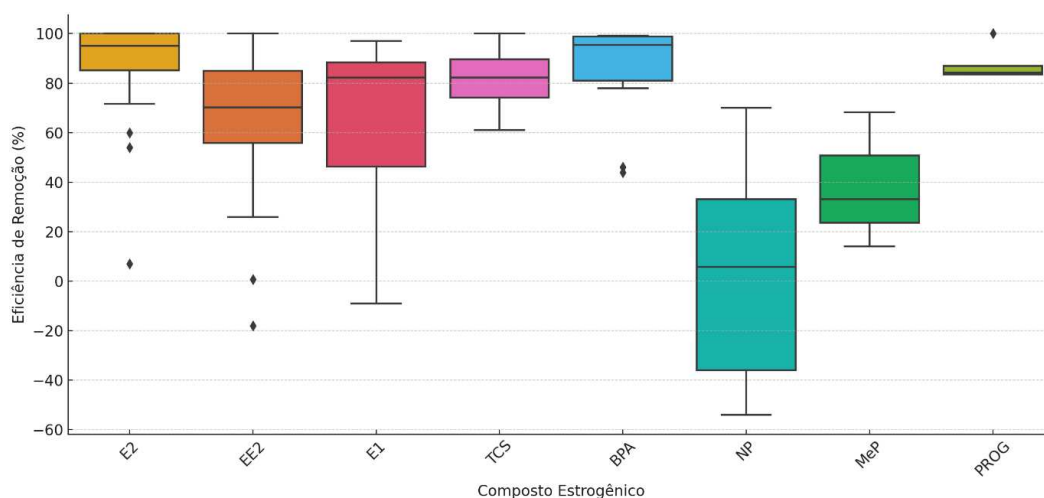
Figura 6 – Distribuições de eficiências de remoção de EEs (%) por cada espécie de microalga em pelo menos três experimentos relacionados nos artigos analisados.



Fonte: elaboração própria

A Figura 7 apresenta o gráfico *boxplot* que resume a distribuição da eficiência de remoção para cada composto estrogênico, a partir da agregação dos dados de diferentes espécies de microalgas e condições experimentais. Para alguns compostos, como E2, EE2, E1, TCS e BPA, a maioria dos experimentos demonstra alta eficiência de remoção, com valores próximos ou acima de 80%. Isso sugere que certas microalgas ou consórcios são bastante eficazes na remoção desses poluentes específicos.

Figura 7 – Distribuições de eficiências de remoção de EEs (%) em pelo menos três experimentos relacionados nos artigos analisados.



Fonte: elaboração própria

Para o NP, a eficiência de remoção apresenta uma variabilidade maior. Alguns experimentos mostram alta remoção, enquanto outros reportam baixa eficiência de tratamento, com valores negativos. Isso pode indicar que a eficácia da remoção desse composto é mais dependente das espécies de microalgas ou das condições experimentais empregadas.

Em resumo, os gráficos sugerem que a eficiência da remoção de compostos estrogênicos por microalgas ou consórcios contendo microalgas é altamente dependente do tipo de composto, da espécie de microalga e das condições do sistema de tratamento. Alguns compostos são removidos de forma eficiente na maioria dos casos, enquanto outros apresentam uma variabilidade maior ou uma remoção consistentemente baixa. Essa informação é crucial para selecionar as microalgas ou consórcios mais adequados para o tratamento de águas contaminadas com diferentes tipos de poluentes estrogênicos, bem como os parâmetros operacionais a serem utilizados.

4.7.4 Remoção de atividade estrogênica

Dos 24 artigos selecionados, seis analisaram a remoção de atividade estrogênica no tratamento com microalgas (Tabela 2). Em geral, a redução da atividade estrogênica foi menor ou igual às remoções individuais de cada composto.

Hirooka et al. (2005) avaliaram a remoção de BPA por *Chlorella fusca* em concentrações comumente relatadas em lixiviados de aterro sanitário e remoções superiores a 95% foram encontradas em concentrações de 10 a 80 μM , sem atividade estrogênica detectada.

Esses resultados foram obtidos com intensidade luminosa entre 2 e 36 W/m² (1 W/m² = 4,5 μmol fóton/m²/s) em luz contínua ou com fotoperíodo. O BPA absorvido foi degradado nas células e o intermediário primário de degradação foi identificado como monohidroxibisfenol-A, desaparecendo ao longo do cultivo de 7 sete dias.

Tabela 2 – Resumo dos artigos publicados até março de 2025 nas bases *Scopus* e *WoS* que analisaram a remoção de atividade estrogênica por tratamento com microalgas.

Método	Meio	Conc. Inicial	TDH (dia)	Remoção de atividade estrogênica	Referência
YES	BG11 + E2 e EE2	3 mg.L ⁻¹	7	<i>S. capricornutum</i> : 80% <i>S. quadricauda</i> : 64% <i>C. vulgaris</i> : 68%	(Wu et al., 2021)
YES	Efluente sintético	5 mg.L ⁻¹	40	<i>H. pluvialis</i> E1: 79%, E2: 70%, EE2: 77% <i>S. capricornutum</i> E1: 66%, E2: 70%, EE2: 46% <i>S. quadricauda</i> E1: 74%, E2: 70%, EE2: 65% <i>C. vulgaris</i> E1: 3%, E2: -5%, EE2: 3%	(Wang et al., 2019)
E-screen	Bold 3N modificado	5 μg.L ⁻¹	8	<i>Scenedesmus dimorphus</i> E2: 30% 17α-E2, E1 e E3: não	(Zhang et al., 2014)
YES	Esgoto bruto filtrado, 0,22 μm	11,7 ng.L ⁻¹ Eq-E2	7	<i>C. reinhardtii</i> : 46,2% <i>S. obliquus</i> : 81,1% <i>C. pyrenoidosa</i> : 64,5% <i>C. vulgaris</i> : 56,5%	(Zhou et al., 2014)
Duplo-híbrido de levedura	Meio Bristol modificado	2,3 a 36,5 mg.L ⁻¹	7	<i>Chlorella fusca</i> var. <i>vacuolata</i> BPA: 100%	(Hirooka et al., 2005)
BLYES	Efluente sintético	17 e 0,325 mg.L ⁻¹	15	Consórcio de microalgas BPA: -13% (500 mg/L ⁻¹ SSV) - 600% (300 mg/L ⁻¹ SSV) TCS: 33,3% (500 mg/L ⁻¹ SSV) - 337% (300 mg/L ⁻¹ SSV)	(Atengueño-Reyes et al., 2024)

Zhou et al. (2014) trabalharam com efluente bruto de ETE esterilizado por membranas de 0,22 μm. As eficiências de remoção de EEs e da atividade estrogênica foram avaliadas com quatro espécies de microalgas verdes: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris*. A redução de BPA, E1 e PROG foi superior a 80% para todas as microalgas; no entanto, a concentração de NP aumentou em três dos quatro

tratamentos, sendo que somente *S. obliquus* removeu NP, mas com baixa eficiência (5%). Mesmo com aumento na concentração de NP no efluente dos fotobiorreatores, a atividade estrogênica no efluente final foi reduzida entre 46 e 81% nos quatro tratamentos.

O desempenho da remoção de estrogênio por quatro espécies de microalgas foi monitorado por 40 dias por Wang et al. (2019). *Haematococcus pluvialis*, *Selenastrum capricornutum* e *Scenedesmus quadricauda* efetivamente degradaram E1, e a remoção chegou a 97, 80 e 97%, respectivamente. Em todos os casos, a eficiência de remoção de E2 alcançou 100%. O EE2 se mostrou recalcitrante, e apenas *H. pluvialis* e *S. quadricauda* conseguiram promover 85% de remoção. Em 10 dias, a atividade estrogênica de E1 e E2 foi reduzida por *H. pluvialis* em torno de 79% e 70%, respectivamente, que também reduziu em 77% a potência de EE2 em 20 dias. Desempenho aproximado foi observado para *S. capricornutum* e *S. quadricauda*. Em contraste, *C. vulgaris* não conseguiu eliminar a atividade estrogênica dos três estrogênios. Os autores deduziram que *C. vulgaris* removeu o E2, principalmente transformando-o em subprodutos desconhecidos que ainda possuíam atividades estrogênicas.

No estudo de Wu et al. (2021), todas as três culturas de microalgas utilizadas foram capazes de degradar EE2 (de 55 a 83%) e E2 (de 73 a 91%) dentro de 7 dias. Os resultados do ensaio YES registraram 68, 64 e 80% de redução da atividade estrogênica para *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *S. capricornutum*, respectivamente. Os autores demonstraram que os principais mecanismos de remoção de estrogênio por tratamento com microalgas incluíram a biotransformação e a fotólise indireta induzida por MOE algal. Além disso, os autores ressaltam que estudos mais recentes mostraram que MOE em culturas de algas promove a produção fotoquímica de espécies reativas de curta duração, que têm potencial para contribuir para o tratamento avançado de efluentes.

O estudo de Atengueño-Reyes et al. (2024) investigou a remoção BPA e TCS com uma cultura mista de microalgas (*S. obliquus* e *Desmodesmus sp.*). A atividade estrogênica foi avaliada com ensaio "Bio-Luminescent Yeast Estrogen Screen" (BLYES), que emprega leveduras *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para produzir uma resposta bioluminescente na presença de compostos estrogênicos. A atividade estrogênica do BPA aumentou 7 vezes na menor concentração de biomassa microalgal avaliada no tratamento do efluente (300 mg.L^{-1}) e 1,13 vezes na maior concentração (500 mg.L^{-1}). Para TCS, a atividade estrogênica aumentou 4,37 vezes na menor concentração microalgal e diminuiu 0,33 vezes na maior concentração. O estudo observou que, embora a remoção dos compostos (especialmente BPA) tenha sido elevada, a atividade estrogênica nem sempre diminuiu proporcionalmente, possivelmente

devido à formação de produtos de degradação. O estudo concluiu que a biodegradação foi a principal via de remoção do BPA, enquanto a fotodegradação contribuiu mais para a remoção do TCS.

Por fim, Zhang et al. (2014) verificaram o desempenho de *Scenedesmus dimorphus* na remoção de 17α -E2, E1, E2 e E3. A eficiência de remoção dos compostos individuais foi alta, em oito dias de tratamento: 85% para 17α -E2 e E1 e 95% para E2 e E3. Na redução de atividade estrogênica, somente o experimento com E2 apresentou diferença estatisticamente significativa (30%). Os outros três estrogênios avaliados mostraram pouca alteração na atividade estrogênica ao longo de oito dias. Uma possível explicação sugerida pelos autores é que os produtos de degradação são tão ou mais fortemente estrogênicos do que o estrogênio original.

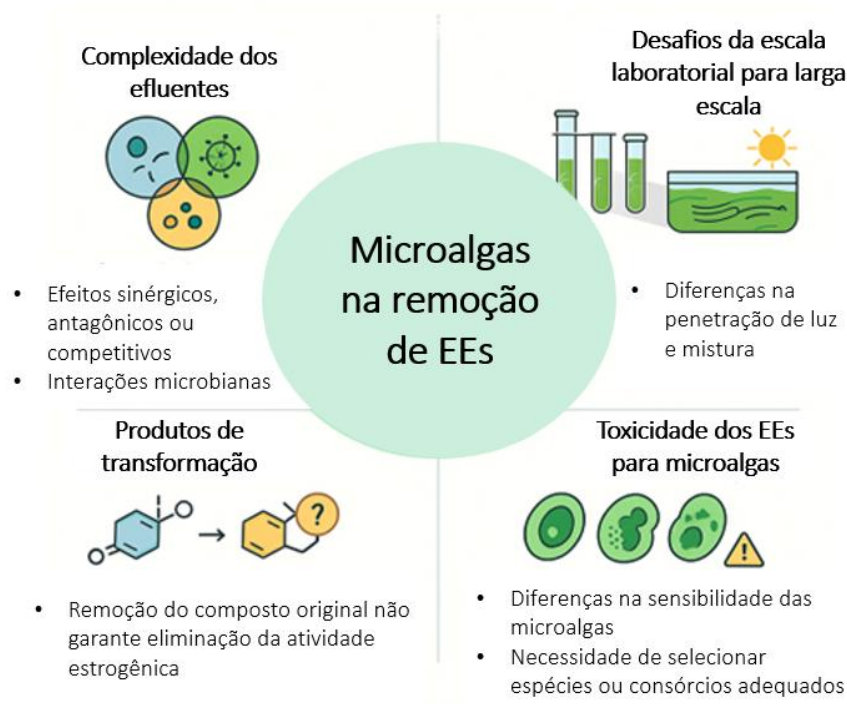
Os estudos analisados indicam que, embora as microalgas apresentem elevada capacidade de remoção de compostos estrogênicos individuais, a redução da atividade estrogênica nem sempre acompanha essa eficiência, o que revela uma limitação importante dos tratamentos baseados exclusivamente na análise da concentração dos compostos originais. Assim, a simples remoção de compostos não garante a eliminação dos efeitos estrogênicos no efluente tratado, isso reforça a necessidade do uso de bioensaios complementares para avaliação da atividade estrogênica residual como ferramenta indispensável na validação de processos de tratamento de águas contaminadas.

4.7.5 Desafios e limitações

O uso de microalgas para a remoção de EEs de águas residuárias é uma tecnologia promissora. No entanto, diversas limitações e desafios permanecem, especialmente em relação à complexidade intrínseca dessas matrizes e à predominância de estudos em escala laboratorial. A Figura 7 resume graficamente esses desafios.

Os esgotos contêm uma ampla gama de contaminantes emergentes, incluindo antibióticos, anti-inflamatórios, produtos de higiene pessoal e hormônios, bem como diversas matérias orgânicas e inorgânicas. A eficiência da remoção de EEs por microalgas é altamente dependente do tipo específico de composto químico (Bai e Acharya, 2019), além disso, diferentes classes de EEs apresentam níveis variados de toxicidade para microalgas (Bano; Malik; Ahammad, 2021), e a presença de múltiplos EEs pode levar a interações sinérgicas, antagônicas ou competitivas, o que afeta as remoções (Wang, Ping; Wong; Tam, 2017).

Figura 8 – Desafios e limitações no uso de microalgas na remoção de compostos estrogênicos.



Fonte: elaboração própria

Em sistemas reais de tratamento de esgoto, as microalgas interagem com diversas populações microbianas, formando relações complexas. Nessas interações, as bactérias podem gerar intermediários durante a degradação de EEs, os quais podem ser tóxicos para as microalgas. Além disso, o cometabolismo que ocorre nesses ambientes, envolvendo diferentes microrganismos presentes no esgoto, diferem das condições controladas de laboratório, onde geralmente se utilizam culturas puras de microalgas (Atengueño-Reyes *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2014).

A presença de matéria orgânica e outros compostos em esgotos pode competir com os EEs pela sorção nos sítios ativos das células microalgais ou afetar a biodegradação (Vale *et al.*, 2022). Além disso, as condições ambientais flutuantes presentes nas ETEs, como temperatura, incidência de luz, pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio dissolvido nos esgotos, podem afetar significativamente o crescimento e a atividade metabólica das microalgas, influenciando a remoção de EEs. Mudanças sazonais nas comunidades microbianas em sistemas externos também podem impactar a eficiência da remoção (Atengueño-Reyes *et al.*, 2024; Gonzalo Ibrahim *et al.*, 2025).

Grande parte da pesquisa sobre remoção de EEs por microalgas discutida nesta revisão foi conduzida em escala laboratorial utilizando meios de cultura, águas residuárias sintéticas ou

efluentes tratados específicos. Embora esses estudos forneçam informações valiosas sobre os mecanismos de remoção, extrapolar esses resultados para sistemas de tratamento em larga escala representa um desafio significativo.

Condições laboratoriais altamente controladas (por exemplo, culturas de algas puras em meio padrão autoclavado) diferem substancialmente das condições encontradas em sistemas reais de tratamento de esgotos. Fatores como penetração de luz, mistura, produtividade de biomassa e interações com outros microrganismos, que são complexos em sistemas reais, são frequentemente simplificados em estudos laboratoriais. Estudos em sistemas que replicam condições externas (luz, transferência de massa) mostram que a remoção de EEs pode ser limitada pela ausência de radiação UV ou por alterações nas populações microbianas devido à sazonalidade (Gonzalo Ibrahim *et al.*, 2025).

Muitos estudos laboratoriais concentram-se na remoção de EEs individuais, enquanto as águas residuais contêm misturas complexas. A interação entre diferentes EEs pode afetar as vias de remoção e a eficiência geral do processo. Além disso, a remoção do composto original não garante a eliminação da atividade estrogênica, uma vez que os produtos de transformação podem manter ou até mesmo aumentar essa atividade. A identificação e a avaliação da toxicidade desses produtos de degradação requerem estudos aprofundados.

A toxicidade de certos EEs para microalgas pode limitar sua aplicação em ETEs. A sensibilidade e a tolerância das microalgas variam entre as espécies. Por isso, a seleção de espécies ou consórcios de microalgas adequados que possam tolerar e remover eficazmente uma ampla gama de EEs em águas residuais complexas é crucial (Atengueño-Reyes *et al.*, 2024; Bano; Malik; Ahammad, 2021).

4.8 Conclusão

A revisão da literatura apresentada demonstra a importância e a complexidade da remoção de desreguladores endócrinos e estrogênios ambientais em efluentes. Embora os processos anaeróbios, como dos reatores UASB, apresentem limitações na remoção de certos EEs e possam até mesmo aumentar a concentração de alguns compostos, o pós-tratamento em sistemas baseados em microalgas e consórcios microalgas-bactérias se destaca como alternativa promissora para alcançar níveis mais elevados de remoção de EEs e reduzir a toxicidade dos efluentes. Estes sistemas oferecem a vantagem de combinar a remoção de poluentes com a produção de biomassa e contribui para uma abordagem mais sustentável e circular do tratamento de efluentes.

O uso de microalgas e seus consórcios com bactérias tem alto potencial para a remoção de EEs em sistemas aquosos, sendo capaz de degradar compostos altamente persistentes e reduzir significativamente a atividade estrogênica. Os mecanismos envolvidos, como sorção, biodegradação e fotólise indireta, são influenciados por variáveis ambientais e operacionais, como pH, luz, densidade microalgal e TDH. Apesar dos avanços evidenciados nos estudos revisados, ainda existem limitações importantes para aplicações em larga escala. Destacam-se a complexidade das águas residuárias reais, as interações entre diferentes EEs e com outras populações microbianas, a variabilidade de respostas entre espécies de microalgas, a formação de subprodutos com atividade estrogênica e a escassez de investigações em escala piloto. A extrapolação de resultados laboratoriais requer cautela, sendo essencial o desenvolvimento de estudos em condições ambientais reais que considerem a interação entre contaminantes, ecologia microbiana e impactos sazonais. Pesquisas futuras devem se concentrar na seleção de espécies mais tolerantes, no aprimoramento dos sistemas de tratamento híbrido e na avaliação da toxicidade dos subprodutos, para consolidar esta biotecnologia como uma alternativa sustentável para o controle da poluição estrogênica.

8.1 Referências

ADITYA, Lisa; MAHLIA, T. M. Indra; NGUYEN, Luong N.; VU, Hang P.; NGHIEM, Long D. Microalgae-bacteria consortium for wastewater treatment and biomass production. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 838, 10 Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155871>.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas. Brasília: ANA, 2017. 88 p. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/ATLASESGOTOSDespoluicaoodeBaciasHidrograficas-ResumoExecutivo_livro.pdf> Acesso em 05.04.2025.

ALVES, Daniela Pereira da Silva; TEIXEIRA, Flaviane Borges; TEÓFILO, Monatha Nayara Guimarães; COTRIM, Carlos Filipe Camilo; DE PAULA SILVA, Junilson Augusto; ALMEIDA, Luciane Madureira; BAILÃO, Elisa Flávia Luiz Cardoso. Use of ecotoxicological bioindicators in effluent monitoring — legal implications in Brazil. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, [s. l.], vol. 29, 2024. <https://doi.org/10.1590/S1413-415220230054>.

ANDRADE, Diva Souza; COLOZZI FILHO, Arnaldo. *Microalgas de águas continentais*. Londrina: IAPAR, 2014. vol. 3.

ARCANJO, Gemima S.; DOS SANTOS, Carolina R.; CAVALCANTE, Bárbara F.; MOURA, Gabriela de A.; RICCI, Bárbara C.; MOUNTEER, Ann H.; SANTOS, Lucilaine V.S.; QUEIROZ, Luciano M.; AMARAL, Míriam CS. Improving biological removal of pharmaceutical active compounds and estrogenic activity in a mesophilic anaerobic osmotic membrane bioreactor treating municipal sewage. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 301, 1 Aug. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134716>.

ATENGUEÑO-REYES, Karina; VELÁSQUEZ-ORTA, Sharon B.; YÁÑEZ-NOGUEZ, Isaura; MONJE-RAMÍREZ, Ignacio; ORTA-LEDESMA, María Teresa. Removal processes and estrogenic activity of bisphenol—A and triclosan using microalgae. *Algal Research*, [s. l.], vol. 82, 1 Aug. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103670>.

BAI, Xuelian; ACHARYA, Kumud. Removal of seven endocrine disrupting chemicals (EDCs) from municipal wastewater effluents by a freshwater green alga. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 247, p. 534–540, 1 Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.075>.

BANO, Farhat; MALIK, Anushree; AHAMMAD, Shaikh Z. Removal of estradiol, diclofenac, and triclosan by naturally occurring microalgal consortium obtained from wastewater. *Sustainability (Switzerland)*, [s. l.], vol. 13, no. 14, 2 Jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/su13147690>.

BARTON-MACLAREN, T. S.; WADE, M.; BASU, N.; BAYEN, S.; GRUNDY, J.; MARLATT, V.; MOORE, R.; PARENT, L.; PARROTT, J.; GRIGOROVA, P.; PINSONNAULT-COOPER, J.; LANGLOIS, V. S. Innovation in regulatory approaches for endocrine disrupting chemicals: The journey to risk assessment modernization in Canada. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 204, 1 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112225>.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim. Nova*, [s. l.], vol. 30, no. 3, p. 651–666, 2007. .

BIRKETT, Jason W.; LESTER, John N. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process*. 1st ed. [S. l.]: Lewis Publishers, 2002.

BRANDT, Emanuel M.F.; DE QUEIROZ, Fernanda B.; AFONSO, Robson J.C.F.; AQUINO, Sérgio F.; CHERNICHARO, Carlos A.L. Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], vol. 128, p. 718–726, 15 Oct. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.003>.

BRICIU, Rodica Domnica; KOT-WASIK, Agata; NAMIESNIK, Jacek. Analytical Challenges and Recent Advances in the Determination of Estrogens in Water Environments. *Chromatographic Science*, [s. l.], vol. 47, no. 2, p. 127–139, 2009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/chromsci/47.2.127>.

CHENG, Jun; YE, Qing; LI, Ke; LIU, Jianzhong; ZHOU, Junhu. Removing ethinylestradiol from wastewater by microalgae mutant *Chlorella* PY-ZU1 with CO₂ fixation. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 249, p. 284–289, 1 Feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.036>.

CHENG, Ning; WANG, Bing; WU, Pan; LEE, Xinqing; XING, Ying; CHEN, Miao; GAO, Bin. Adsorption of emerging contaminants from water and wastewater by modified biochar: A review. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 273, 15 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116448>.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL; CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DE MINAS GERAIS. *Deliberação Normativa conjunta COPAM / CERH nº 1 de 05 de maio de 2008*. Belo Horizonte: COPAM, 2008

D'ASCENZO, G; CORCIA, A Di; GENTILI, A; MANCINI, R; MASTROPASQUA, R; NAZZARI, M; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. [S. l.: s. n.], 2003.

DE ASSIS, Letícia Rodrigues; CALIJURI, Maria Lúcia; DO COUTO, Eduardo de Aguiar; ASSEMANY, Paula Peixoto. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. *Ecological Engineering*, [s. l.], vol. 106, p. 191–199, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.05.040>.

DE REZENDE, Amanda Teixeira; MOUNTEER, Ann H. Ecological risk assessment of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian surface waters. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 338, 1 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122628>.

DIAS, Amanda Cristina Vieira; GOMES, Frederico Wegenast; BILA, Daniele Maia; SANT'ANNA, Geraldo Lippel; DEZOTTI, Marcia. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 120, p. 41–47, 1 Oct. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>.

DOS SANTOS, Carolina Rodrigues; ROSA E SILVA, Guilherme Otávio; DIAS ARAÚJO, Ane Alice; SERAFIM, Thamis Gualberto; DRUMOND, Guilherme Pinheiro; DOS SANTOS, Vera Lúcia; FERNANDES, Luyara de Almeida; DE ARAÚJO, Juliana Calabria; ARCANJO, Gemima Santos; DE SOUZA SANTOS, Lucilaine Valéria; AMARAL, Míriam Cristina Santos. Granular anaerobic membrane bioreactor coupled hybrid forward osmosis – membrane distillation module for organic matter, nutrient and bisphenol A removal: Integrated assessment of performance, cost, toxicity, and risks. *Chemical Engineering Journal*, [s. l.], vol. 504, 15 Jan. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.158022>.

DÜPONT, Adriana; LOBO, Eduardo Alcayaga. Evaluation of the efficiency of the sewage treatment plant from the University of Santa Cruz do Sul (UNISC), RS, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, [s. l.], vol. 24, no. 2, p. 119–126, 6 Sep. 2012. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2012005000031>.

DURCIK, Martina; GROBIN, Andrej; ROŠKAR, Robert; TRONTELJ, Jurij; PETERLIN MAŠIČ, Lucija. Estrogenic potency of endocrine disrupting chemicals and their mixtures detected in environmental waters and wastewaters. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 330, 1 Jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138712>.

EDSTAC. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report. Disponível em: <<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final>>. Acesso em: 8 nov. 2023.

EKPEGHERE, Kalu Ibe; SIM, Won Jin; LEE, Heon Jun; OH, Jeong Eun. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 640–641, p. 1015–1023, 1 Nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>.

EPA. Status of Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) List 1 Screening Conclusions. United States Environmental Protection Agency, [s. l.], , p. 1–19, 2023. Available at: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2023-0474-0001>. Accessed on: 7 Nov. 2023.

EU. Regulation (EC) No 1907/2006 - Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). European Agency for Safety and Health at Work, [s. l.], , p. 1–574, 2006. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1907/2023-08-06>. Accessed on: 7 Nov. 2023.

FALLAHI, Alireza; REZVANI, Fariba; ASGHARNEJAD, Hashem; KHORSHIDI, Ehsan; HAJINAJAF, Nima; HIGGINS, Brendan. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 272, 1 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129878>.

FANG, Ting Yien; PRAVEENA, Sarva Mangala; DEBURBURE, Claire; ARIS, Ahmad Zaharin; ISMAIL, Sharifah Norkhadajah Syed; RASDI, Irniza. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 165, p. 358–368, 1 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.051>.

FILHO, Ricardo W. R.; VIEIRA, Juliana C. A. E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. [S. l.: s. n.], 2006.

FORNER-PIQUER, Isabel; BEATO, Silvia; PISCITELLI, Fabiana; SANTANGELI, Stefania; DI MARZO, Vincenzo; HABIBI, Hamid R.; MARADONNA, Francesca; CARNEVALI, Oliana. Effects of BPA on zebrafish gonads: Focus on the endocannabinoid system. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 264, 1 Sep. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114710>.

GEA, Marta; TOSO, Anna; SCHILIRÒ, Tiziana. Estrogenic activity of biological samples as a biomarker. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 740, 20 Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140050>.

GHAED, V.; SALIMI, A.; ATTAR, R.; MIRVAKILI, A.; SALIMIAN, J. From waste to resource: Evaluating microalgae for enhanced metal adsorption in oil and gas refinery effluents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, [s. l.], vol. 13, no. 2, 1 Apr. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.115844>.

GONZALO IBRAHIM, Félix Gaspar; LÓPEZ-SERNA, Rebeca; MUÑOZ TORRE, Raúl; CABRERIZO PASTOR, Ana; DE GODOS CRESPO, Ignacio. Evaluating emerging pollutant removal in a scale-down high rate algae pond. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, [s. l.], vol. 13, no. 3, 1 Jun. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.116010>.

HENA, Sufia; GUTIERREZ, Leonardo; CROUÉ, Jean Philippe. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from wastewater using microalgae: A review. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 403, 5 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124041>.

HIROOKA, Takashi; NAGASE, Hiroyasu; UCHIDA, Kotaro; HIROSHIGE, Yuji; EHARA, Yoshie; NISHIKAWA, Jun-Ichi; NISHIHARA, Tsutomu; MIYAMOTO, Kazuhisa; HIRATA, Zazumasa. Biodegradation of bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. [S. l.: s. n.], 2005.

HOM-DIAZ, Andrea; LLORCA, Marta; RODRÍGUEZ-MOZAZ, Sara; VICENT, Teresa; BARCELÓ, Damià; BLÁNQUEZ, Paqui. Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17α -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], vol. 155, p. 106–113, 5 May 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.003>.

HORAK, Ilzé; HORN, Suranie; PIETERS, Rialet. Agrochemicals in freshwater systems and their potential as endocrine disrupting chemicals: A South African context. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 268, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115718>.

KASONGA, Teddy Kabeya; COETZEE, Martie A.A.; KAMIKA, Ilunga; NGOLE-JEME, Veronica M.; BENTEKE MOMBA, Maggy Ndombo. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], vol. 277, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111485>.

KASSOTIS, Christopher D.; VANDENBERG, Laura N.; DEMENEIX, Barbara A.; PORTA, Miquel; SLAMA, Remy; TRASANDE, Leonardo. Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, [s. l.], vol. 8, no. 8, p. 719–730, 1 Aug. 2020. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30128-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30128-5).

KATIBI, Kamil Kayode; YUNOS, Khairul Faezah; MAN, Hasfalina Che; ARIS, Ahmad Zaharin; BIN MOHD NOR, Mohd Zuhair; BINTI AZIS, Rabaah Syahidah. Recent advances in the rejection of endocrine-disrupting compounds from water using membrane and membrane bioreactor technologies: A review. *Polymers*, [s. l.], vol. 13, no. 3, p. 1–52, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13030392>.

KRISHNAN, A. V. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, [s. l.], vol. 132, no. 6, p. 2279–2286, 1 Jun. 1993. <https://doi.org/10.1210/en.132.6.2279>.

LACOUTURE, Aurélie; LAFRONT, Camille; PEILLEX, Cindy; PELLETIER, Martin; AUDET-WALSH, Étienne. Impacts of endocrine-disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 204, 1 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112085>.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], vol. 68, no. 2, p. 859–864, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.859-864.2002>.

LIER, J. Van; MAHMOUD, N.; ZEEMAN, G. Anaerobic wastewater treatment. *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design*. 2nd ed. [S. l.]: IWA Publishing, 2020. p. 701–756. https://doi.org/10.2166/9781789060362_0701.

LIU, Bo; ZHANG, Shen gen; CHANG, Chein Chi. Emerging pollutants—Part II: Treatment. *Water Environment Research*, [s. l.], vol. 91, no. 10, p. 1390–1401, 1 Oct. 2019. <https://doi.org/10.1002/wer.1233>.

LIU, Yu; DAI, Xiaokang; WEI, Jie. Toxicity of the xenoestrogen nonylphenol and its biodegradation by the alga *Cyclotella caspia*. *Journal of Environmental Sciences (China)*, [s. l.], vol. 25, no. 8, p. 1662–1671, 1 Aug. 2013. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60182-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60182-X).

LÓPEZ-VELÁZQUEZ, Khirbet; RONDEROS-LARA, José G.; SALDARRIAGA-NOREÑA, Hugo A.; MURILLO-TOVAR, Mario A.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, Minerva; GUZMÁN-MAR, Jorge L.; HOIL-CANUL, Edwin R.; CABELLOS-QUIROZ, José L. Endocrine-disrupting compounds in urban rivers of the southern border of Mexico: Occurrence and ecological risk assessment. *Emerging Contaminants*, [s. l.], vol. 11, no. 1, 1 Jan. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100456>.

LOUROS, Vitória L.; LIMA, Diana L.D.; LEITÃO, Jorge H.; ESTEVES, Valdemar I.; NADAIS, Helena G.A. Impact of UASB reactors operation mode on the removal of estrone and 17 α -ethinylestradiol from wastewaters. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 764, 10 Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144291>.

LUTTERBECK, Carlos Alexandre; ZERWES, Filipe Vargas; RADTKE, Júlia Fernanda; KÖHLER, Andreas; KIST, Lourdes Teresinha; MACHADO, Ênio Leandro. Integrated system with constructed wetlands for the treatment of domestic wastewaters generated at a rural property – Evaluation of general parameters ecotoxicity and cytogenetics. *Ecological Engineering*, [s. l.], vol. 115, p. 1–8, 1 May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.01.004>.

MA, Yingxiao; SHEN, Wendi; TANG, Tingting; LI, Zihao; DAI, Ruihua. Environmental estrogens in surface water and their interaction with microalgae: A review. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 807, 10 Feb. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150637>.

MANETTI, Marco; TOMEI, Maria Concetta. Anaerobic removal of contaminants of emerging concern in municipal wastewater: Eco-toxicological risk evaluation and strategic selection of optimal treatment. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 912, 20 Feb. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168895>.

MARTINOVIC-WEIGELT, Dalma; MINARIK, Thomas A.; CURRAN, Erin M.; MARCHUK, Jascha S.; PAZDERKA, Matt J.; SMITH, Eric A.; GOLDENSTEIN, Rachel L.; MIRESE, Christine L.; MATLON, Thomas J.; SCHULTZ, Melissa M.; SCHOENFUSS, Heiko L. Environmental estrogens in an urban aquatic ecosystem: I. Spatial and temporal occurrence of estrogenic activity in effluent-dominated systems. *Environment International*, [s. l.], vol. 61, p. 127–137, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.018>.

MATAMOROS, Víctor; GUTIÉRREZ, Raquel; FERRER, Ivet; GARCÍA, Joan; BAYONA, Josep M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 288, p. 34–42, 5 May 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.002>.

NATHANAEL, Rinaldy Jose; ADYANIS, Latonia Nur; OGINAWATI, Katharina. The last decade epidemiologic concern of drinking water contaminants of emerging concern (CECs) in Asian Countries: A scoping review. *Heliyon*, [s. l.], vol. 10, no. 20, 30 Oct. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39236>.

NG, Brian; QUINETE, Natalia; MALDONADO, Stephanie; LUGO, Kathleen; PURRINOS, Julian; BRICEÑO, Henry; GARDINALI, Piero. Understanding the occurrence and distribution of emerging pollutants and endocrine disruptors in sensitive coastal South Florida Ecosystems. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 757, 25 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143720>.

OLEA, Nicolás; PULGAR, Rosa; PÉREZ, Pilar; OLEA-SERRANO, Fátima; RIVAS, Ana; NOVILLO-FERTRELL, Arantzazu; PEDRAZA, Vicente; SOTO, Ana M.; SONNENSCHNEIN, Carlos. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, [s. l.], vol. 104, no. 3, p. 298–305, 1996. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104298>.

OMOIKE, Ogbebor Enaholo; PACK, Robert P.; MAMUDU, Hadii M.; LIU, Ying; WANG, Liang. A cross-sectional study of the association between perfluorinated chemical exposure and cancers related to deregulation of estrogen receptors. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 196, 1 May 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110329>.

PARLADÉ, Eloi; HOM-DIAZ, Andrea; BLÁNQUEZ, Paqui; MARTÍNEZ-ALONSO, Maira; VICENT, Teresa; GAJU, Nuria. Effect of cultivation conditions on B-estradiol removal in laboratory and pilot-plant photobioreactors by an algal-bacterial consortium treating urban wastewater. *Water Research*, [s. l.], vol. 137, p. 86–96, 15 Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.060>.

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 and Technology*, [s. l.], vol. 66, no. 12, p. 2562–2569, 2012. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.482>.

QUINTANEIRO, C.; PATRÍCIO, D.; NOVAIS, S. C.; SOARES, A. M.V.M.; MONTEIRO, M. S. Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 586, p. 390–400, 15 May 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.153>.

RAMOS, Márcio Daniel Nicodemos; GOMES, Tamara Maria; DE AQUINO, Sérgio Francisco; AGUIAR, André. Sewage treatment in cities of the state of Minas Gerais, Brazil, that use the UASB reactor as the only biological treatment: A case study. *Journal of Water Process Engineering*, [s. l.], vol. 56, 1 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104509>.

RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, [s. l.], vol. 88, no. 10, p. 3411–3424, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>.

RODRIGUES-SILVA, Fernando; MASCENO, Gabriella Paini; PANICIO, Paloma Pucholobek; IMOSKI, Rafaela; PROLA, Liziê Daniela Tentler; VIDAL, Carla Bastos; XAVIER, Claudia Regina; RAMSDORF, Wanessa Algarte; PASSIG, Fernando Hermes; LIZ, Marcus Vinicius de. Removal of micropollutants by UASB reactor and post-treatment by Fenton and photo-Fenton: Matrix effect and toxicity responses. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 212, 1 Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113396>.

RUKSRIHONG, Chantima; PHATTARAPATTAMAWONG, Songkeart. Removals of estrone and 17 β -estradiol by microalgae cultivation: kinetics and removal mechanisms. *Environmental Technology (United Kingdom)*, [s. l.], vol. 40, no. 2, p. 163–170, 15 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1384068>.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; TURNES-CAROU, I.; BESADA, V.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 529, p. 121–130, 1 Oct. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.048>.

SHI, Wenxin; WANG, Lizheng; ROUSSEAU, Diederik P.L.; LENS, Piet N.L. Removal of estrone, 17 α -ethynylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environmental Science and Pollution Research*, [s. l.], vol. 17, no. 4, p. 824–833, May 2010. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0301-7>.

SHIN, Young Hwan; SCHIDEMAN, Lance; PLEWA, Michael J.; ZHANG, Peng; SCOTT, John; ZHANG, Yuanhui. Fate and transport of estrogenic compounds in an integrated swine manure treatment systems combining algal-bacterial bioreactor and hydrothermal processes for improved water quality. *Environmental Science and Pollution Research*, [s. l.], vol. 26, no. 16, p. 16800–16813, 1 Jun. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04969-7>.

SILVA, Priscila Romana; MOUNTEER, Ann H; BENJAMIN, Laercio dos Anjos; DE ALMEIDA, Edinael Rodrigues; VITORINO, Flavia Barros; ARCANJO, Gemima Santos; DOS SANTOS PETERSEN, Vinicius Rodrigues. Evaluation of toxicity and estrogenicity in UASB - Treated municipal sewage. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 268, Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128778>.

SUDHAKAR, Muthiyal Prabakaran; MAURYA, Rahulkumar; MEHARIYA, Sanjeet; KARTHIKEYAN, Obulisamy Parthiba; DHARANI, Gopal; ARUNKUMAR, Kulanthiyesu; PEREDA, Sandra V.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, María C.; BUSCHMANN, Alejandro H.; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Feasibility of bioplastic production using micro- and macroalgae- A review. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 240, 1 Jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117465>.

SUN, Xiao Long; WANG, Yuan; XIONG, Hao Qin; WANG, Shao Ting; FANG, Yi Chuan; XIANG, Hong. Removal of environmental estrogens from wastewater by microalgae under the influence of bacteria. *Journal of Cleaner Production*, [s. l.], vol. 414, 15 Aug. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137635>.

TENG, Miaomiao; WANG, Chen; SONG, Min; CHEN, Xiangguang; ZHANG, Jie; WANG, Chengju. Chronic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to flutolanil leads to endocrine disruption and reproductive disorders. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 184, 1 May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109310>.

THONGPRAKAISANG, Siriporn; THANTANAWAT, Apinya; RANGKADILOK, Nuchanart; SURIYO, Tawit; SATAYAVIVAD, Jutamaad. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, [s. l.], vol. 59, p. 129–136, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>.

VALE, Francisca; SOUSA, Cátia A.; SOUSA, Henrique; SANTOS, Lúcia; SIMÕES, Manuel. Impact of parabens on microalgae bioremediation of wastewaters: A mechanistic study. *Chemical Engineering Journal*, [s. l.], vol. 442, 15 Aug. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136374>.

VASSALLE, Lucas; GARCÍA-GALÁN, María Jesús; AQUINO, Sérgio F.; AFONSO, Robson José de Cássia Franco; FERRER, Ivet; PASSOS, Fabiana; R MOTA, Cesar. Can high rate algal ponds be used as post-treatment of UASB reactors to remove micropollutants? *Chemosphere*, [s. l.], vol. 248, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125969>.

WANG, Ping; LUAN, Jianwen; LUO, Lijuan. Removal of estrogens from primary settled sewage by repeated culture of *Selenastrum capricornutum*. *Water Science and Technology*, [s. l.], vol. 88, no. 11, p. 2837–2848, 10 Dec. 2023. <https://doi.org/10.2166/wst.2023.390>.

WANG, Ping; WONG, Yuk Shan; TAM, Nora Fung Yee. Green microalgae in removal and biotransformation of estradiol and ethinylestradiol. *Journal of Applied Phycology*, [s. l.], vol. 29, no. 1, p. 263–273, 1 Feb. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0960-y>.

WANG, Rui; LI, Feng; RUAN, Weifeng; TAI, Yiping; CAI, Hongbo; YANG, Yang. Removal and degradation pathway analysis of 17 β -estradiol from raw domestic wastewater using immobilised functional microalgae under repeated loading. *Biochemical Engineering Journal*, [s. l.], vol. 161, 15 Sep. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107700>.

WANG, Rui; WANG, Sai; TAI, Yiping; TAO, Ran; DAI, Yunv; GUO, Jingjing; YANG, Yang; DUAN, Shunshan. Biogenic manganese oxides generated by green algae *Desmodesmus* sp. WR1 to improve bisphenol A removal. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 339, p. 310–319, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.026>.

WANG, Yuwen; SUN, Qian; LI, Yan; WANG, Hongjie; WU, Kun; YU, Chang Ping. Biotransformation of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by four species of microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 180, p. 723–732, 30 Sep. 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.061>.

WANG, Yuwen; SUN, Qian; LI, Yan; WANG, Hongjie; WU, Kun; YU, Chang Ping. Biotransformation of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by four species of microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 180, p. 723–732, 30 Sep. 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.061>.

WU, Pei Hsun; YEH, Hsin Yi; CHOU, Pei Hsin; HSIAO, Wen Wei; YU, Chang Ping. Algal extracellular organic matter mediated photocatalytic degradation of estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 209, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111818>.

XIAO, Rui; CARTER, Erika; ALLEN, Austin; TAN, Pei Lin; ZHENG, Yu Hua; CHEN, Qian; ZHU, Shun Ni; POPAT, Sudeep C.; KNOPF, Allan; WILLIAMS, Clinton F.; CHOU, Howard H.; CHEN, Huan. Nutrient recovery from high-salinity dairy wastewater through the cultivation of acclimatized microalgae. *Journal of Water Process Engineering*, [s. l.], vol. 72, 1 Apr. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107430>.

YE, Qing; CHENG, Jun; GUO, Wangbiao; XU, Junchen; LI, Ke; ZHOU, Junhu. Serial lantern-shaped draft tube enhanced flashing light effect for improving CO₂ fixation with microalgae in a gas-lift circumflux column photobioreactor. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 255, p. 156–162, 1 May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.127>.

YILMAZ, Bayram; TEREKECI, Hakan; SANDAL, Suleyman; KELESTIMUR, Fahrettin. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, [s. l.], vol. 21, no. 1, p. 127–147, 1 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09521-z>.

YU, Chang Ping; DEEB, Rula A.; CHU, Kung Hui. Microbial degradation of steroidal estrogens. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 91, no. 9, p. 1225–1235, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.112>.

ZHANG, Yongli; HABTESELASSIE, Mussie Y.; RESURRECCION, Eleazer P.; MANTRIPRAGADA, Vijaya; PENG, Shanshan; BAUER, Sarah; COLOSI, Lisa M. Evaluating removal of steroid estrogens by a model alga as a possible sustainability benefit of hypothetical integrated algae cultivation and wastewater treatment systems. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, [s. l.], vol. 2, no. 11, p. 2544–2553, 3 Nov. 2014. <https://doi.org/10.1021/sc5004538>.

ZHOU, Guang Jie; YING, Guang Guo; LIU, Shan; ZHOU, Li Jun; CHEN, Zhi Feng; PENG, Fu Qiang. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, [s. l.], vol. 16, no. 8, p. 2018–2027, 2014. <https://doi.org/10.1039/c4em00094c>.

ZIELIŃSKI, Bartosz; MIADLICKI, Piotr; PRZEPIÓRSKI, Jacek. Development of activated carbon for removal of pesticides from water: case study. *Scientific Reports*, [s. l.], vol. 12, no. 1, 1 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25247-6>.

5 REMOÇÃO DE TOXICIDADE E ATIVIDADE ESTROGÊNICA DO EFLUENTE DO REATOR UASB POR CONSÓRCIO MICROALGAS-BACTÉRIAS

Resumo

O tratamento terciário de esgoto sanitário por consórcios de microalgas-bactérias apresenta reduções satisfatórias em matéria orgânica, nutrientes, microrganismos patogênicos e micropoluentes orgânicos. No entanto, a remoção de toxicidade e de atividade estrogênica e os mecanismos envolvidos nessas remoções não foram explorados nos estudos encontrados na literatura. Neste estudo, o papel de um consórcio de microalgas-bactérias foi investigado para remoção de atividade estrogênica e das toxicidades aguda e crônica no tratamento terciário de esgoto municipal proveniente de um reator *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB). O tratamento com consórcio removeu a toxicidade aguda do efluente em 24 h. A atividade de bactérias heterotróficas presentes no efluente do reator UASB foi responsável por reduzir quase metade da toxicidade do esgoto, no entanto, apenas o tratamento com consórcio de microalgas-bactérias conseguiu remover toda a toxicidade aguda. Os compostos responsáveis pela estrogenicidade do esgoto foram biodegradados nas primeiras horas de tratamento com consórcio e após 48 h, não foram mais detectados na fração dissolvida e em sólidos suspensos maiores que 0,7 μm . Na fração de sólidos entre 0,45 e 0,7 μm , a remoção de atividade estrogênica atingiu 94,7% após 48 h. Os resultados demonstram que o tratamento terciário contendo consórcio de microalgas-bactérias é uma abordagem eficaz para remover a toxicidade e a atividade estrogênica do esgoto sanitário.

Palavras-chave: *Ceriodaphnia dubia*; Estrogenicidade; Reator UASB; Biodegradação

5.1 Introdução

A presença de micropoluentes em águas residuárias, mesmo em concentrações baixas, tem se mostrado um fator de risco ecológico e um desafio crescente para os sistemas de tratamento convencionais (de Rezende; Mounteer, 2023; Nathanael; Adyanis; Oginawati, 2024). Entre esses contaminantes emergentes destacam-se os estrogênios ambientais (EEs). Esses poluentes químicos, presentes no ambiente, podem afetar as funções fisiológicas de humanos ou outros animais, pois são capazes de se ligar ao receptor de estrogênio e imitar os estrogênios endógenos (Bila; Dezotti, 2007; Ma *et al.*, 2022). A complexidade das matrizes ambientais, compostas por misturas de múltiplos micropoluentes, dificulta a identificação

individual dessas substâncias e a avaliação de seus efeitos combinados, tornando o monitoramento desafiador (Fang *et al.*, 2016).

A detecção recorrente de EEs em estações de tratamento de esgoto (ETE) e nos corpos hídricos globais evidencia a limitação dos processos convencionais em promover a remoção completa desses poluentes (Dias *et al.*, 2015; Durcik *et al.*, 2023). Em alguns casos, estudos apontam que a concentração de certos compostos pode até aumentar após tratamentos com reatores anaeróbios, como os do tipo UASB, em decorrência da degradação parcial dos compostos originais (Queiroz *et al.*, 2012).

Nesse cenário, os bioensaios, como o *yeast estrogen screen* (YES), têm se consolidado como ferramentas fundamentais para a quantificação da atividade estrogênica total, servindo como indicador da presença de EEs e da atividade biológica dessas matrizes ambientais (Dias *et al.*, 2015). De forma similar, ensaios capazes de sinalizar potenciais efeitos tóxicos de efluentes em organismos-teste são de grande importância na avaliação ambiental. Eles avaliam aspectos essenciais não cobertos por variáveis abióticas, como a biodisponibilidade e os efeitos da interação de poluentes sobre os organismos (Alves *et al.*, 2024).

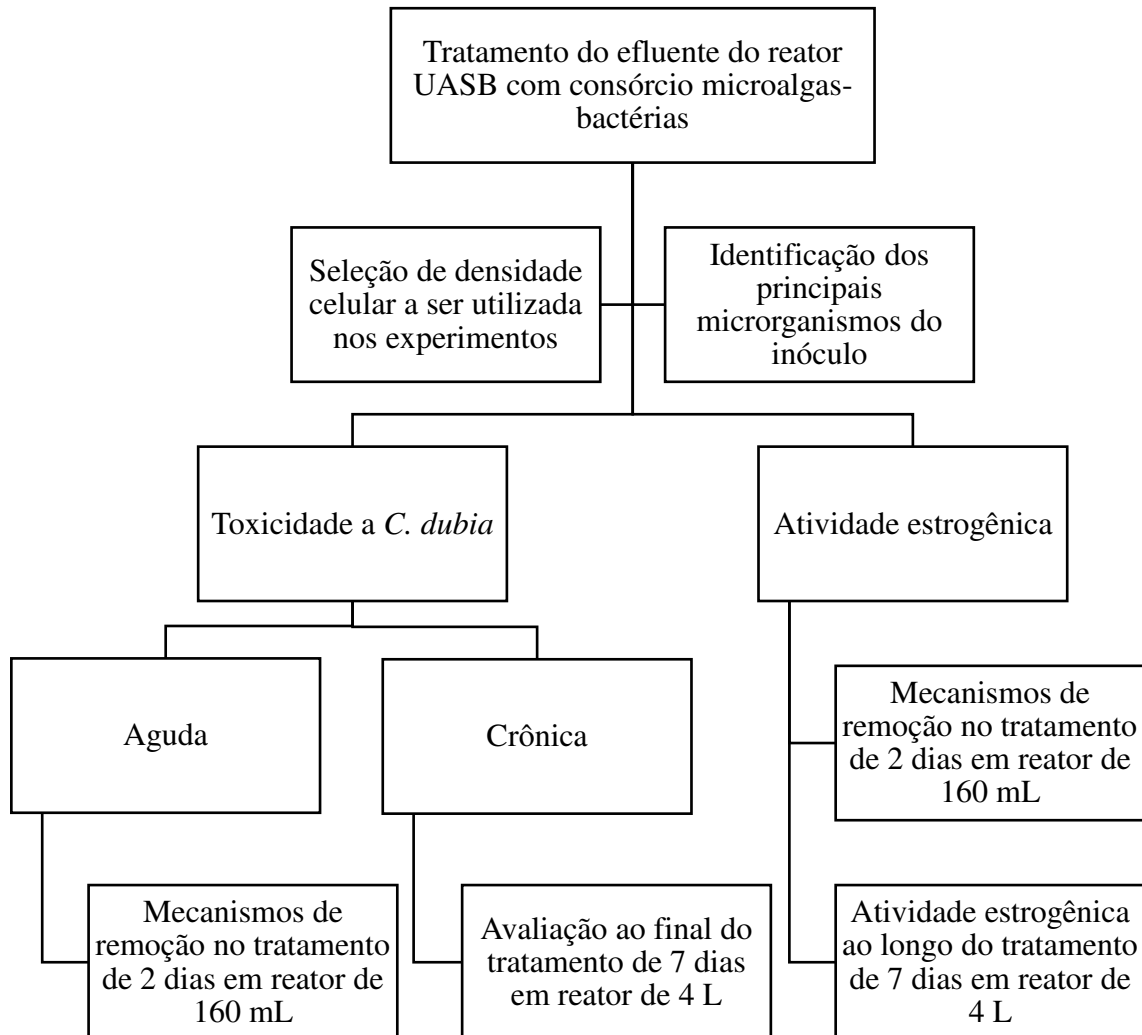
Diante da crescente demanda por tecnologias de tratamento mais eficazes e sustentáveis, e da necessidade de soluções que também contribuam para a geração de energia limpa, sistemas baseados em microalgas, especialmente em consórcios com bactérias, têm sido investigados como alternativas promissoras (Vassalle *et al.*, 2020). Esses consórcios apresentam vantagens como a produção de oxigênio, o aproveitamento de nutrientes do esgoto e a remoção de poluentes por mecanismos de adsorção, biodegradação e fotodegradação (Matamoros *et al.*, 2016).

Embora diversos estudos tenham demonstrado a capacidade de consórcios de microalgas-bactérias na remoção desses poluentes, a maioria se concentra em compostos específicos em meios sintéticos ou em espécies individuais de microalgas (Wang, Yuwen *et al.*, 2019a; Wu, Pei Hsun *et al.*, 2021). Existe, portanto, uma lacuna na avaliação da remoção de atividade biológica em águas residuárias reais, especialmente com uma abordagem direcionada aos efeitos (*effect-based approaches*).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de um consórcio de microalgas-bactérias, cultivado a partir de efluente real, em remover a toxicidade e a atividade estrogênica de esgoto secundário, bem como investigar os mecanismos envolvidos nesse processo.

5.2 Material e Métodos

Figura 1 – Fluxograma detalhado das etapas experimentais para avaliação de remoção de toxicidade e atividade estrogênica do efluente do reator UASB



Fonte: elaboração própria

5.2.1 Efluente

O efluente do reator UASB foi coletado na ETE do bairro Violeira, no município de Viçosa (população estimada 79.910; IBGE, 2021), localizada no sudeste de Minas Gerais (20°45'14" S e 42°52'55" W). A altura do reator é de 5,7 m e o volume de 48 m³. O efluente foi transportado para o Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e armazenado a 4 ± 2°C.

5.2.2 Inóculos

O inóculo inicial contendo o consórcio microalgas-bactérias foi preparado a partir do efluente do reator UASB. O efluente foi mantido a 24 °C com luz LED branca (3000 lux) e fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h escuro em frasco Mariotte de 20 L até o crescimento de microalgas autóctones constatado por análise visual. Após o desenvolvimento do consórcio microalgas-bactérias, os inóculos foram abastecidos regularmente com o efluente e mantidos em homogeneização contínua por meio de bomba submersa.

O volume de 200 mL de cada inóculo utilizado nos experimentos foi centrifugado a 2.263 g (Sorvall Legend Mach 1.6, Thermo Scientific) e conservado em solução tampão fosfato (KH₂PO₄ e K₂HPO₄, pH 7,2) a -23 ± 2°C. A identificação dos principais microrganismos presentes nos inóculos ao longo dos experimentos (aproximadamente um ano) foi realizada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil) por meio do sequenciamento de amplicons de regiões gênicas ribossomais. O DNA genômico total das amostras foi extraído, seguido pela preparação de bibliotecas de sequenciamento direcionadas às regiões 16S rRNA para a identificação de bactérias e 18S rRNA (V9) para a caracterização de eucariotos, incluindo as microalgas. O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina (MiSeq ou NextSeq), no formato *paired-end*, com uma profundidade de aproximadamente 100.000 leituras por amostra para cada alvo genético (16S e 18S). Os resultados brutos do sequenciamento foram fornecidos em arquivos FastQ, acompanhados de uma planilha (*ranktable*) contendo a tabela de abundância relativa das unidades taxonômicas identificadas. O acesso aos resultados foi disponibilizado através da plataforma Neobiome.

5.2.3 Extração da matéria orgânica extracelular

A extração da matéria orgânica extracelular (MOE) foi realizada de acordo com o método relatado por Tian et al. (2019). O inóculo contendo 3,7 x 10⁹ cel.L⁻¹ foi centrifugado a 4000 g por 15 minutos (Sorvall Legend Mach 1.6, Thermo Scientific) e o sobrenadante foi

filtrado em membrana de ésteres de celulose de 0,45 μm (Filter Pro). A membrana foi previamente lavada com três porções de 10 mL de água purificada por sistema de osmose reversa (OS20LXE, GEHAKA) para eliminar interferências de material orgânico presente nas membranas. A concentração de MOE foi quantificada por um analisador de carbono orgânico dissolvido (TOC-V_{CSH}, Shimadzu). As células de microalgas foram contadas em câmara Neubauer, com ampliação de 200x (Microscópio Invertido IX51, Olympus).

5.2.4 Seleção da densidade celular

Um estudo inicial foi conduzido para a seleção da densidade celular de microalgas a ser utilizada nos demais experimentos. Três densidades celulares foram testadas: $2,2 \times 10^7$; $2,2 \times 10^8$ e $2,2 \times 10^9$ cel.L⁻¹ (Sistemas 1, 2 e 3). A densidade celular de $2,2 \times 10^8$ cel.L⁻¹ foi correspondente à proporção de 10% (v/v) de inóculo/esgoto, comumente utilizada nos tratamentos com consórcio microalgas-bactérias (Braga *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2023). Para inocular os frascos com a densidade algal desejada, o inóculo foi centrifugado a 2.263 g por 5 min, ressuscitado no efluente e alíquotas do inóculo ressuscitado foram adicionadas aos frascos de teste.

5.2.5 Reatores

Dois tipos de reatores foram usados neste estudo, o primeiro consistiu em um recipiente retangular de vidro (30x15x15 cm) mantido em incubadora a 26 ± 1 °C sob iluminação de lâmpadas LED brancas (3000 lux) com fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h escuro e homogeneização contínua por meio de bomba submersa. O segundo reator consistiu em frascos Erlenmeyer de 250 ml cobertos com plástico filme de PVC perfurados para permitir a troca gasosa. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora a 100 rpm sob iluminação LED (6000 lux, $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) com fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h escuro e temperatura ambiente de 24 ± 1 °C.

5.2.6 Arranjo experimental

Os reatores retangulares continham 3,6 L de efluente e 0,4 L de inóculo (este volume total foi necessário para análises de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*). Dois reatores foram operados em paralelo, um para análise diária de estrogenicidade e parâmetros físico-químicos e outro para análise de toxicidade crônica ao final dos 7 dias de tratamento (após decaimento de clorofila-a).

Os experimentos realizados com frascos Erlenmeyer continham: 1) 160 mL da mistura efluente UASB + inóculo e 2) 160 mL de meio BG11 autoclavado + 17 β -estradiol (E2). O meio

BG11 autoclavado contendo 20 ng.L^{-1} de E2 foi utilizado nos experimentos para avaliação dos mecanismos de remoção de atividade estrogênica. A cada coleta realizada foram retirados 3 frascos de tratamentos idênticos, e seus conteúdos foram combinados para posterior análise. Esses experimentos tiveram duração de 48 h, até completa remoção de toxicidade ou estrogenicidade.

5.2.7 Mecanismos de remoção de toxicidade e atividade estrogênica

Um experimento com seis tratamentos foi conduzido para avaliar as eficiências e os mecanismos de remoção de toxicidade e atividade estrogênica do efluente. É importante destacar que, em cada tratamento, diferentes mecanismos podem estar presentes, por esse motivo, seis tratamentos foram realizados para restringir e possibilitar a identificação dos mecanismos predominantes.

Para evitar iluminação quando desejado, os frascos Erlenmeyer foram cobertos com papel alumínio. Para avaliar a adsorção de compostos com atividade estrogênica no consórcio, a atividade estrogênica foi quantificada tanto na fração líquida quanto nas frações sólidas do conteúdo do reator do Tratamento 1 (efluente inoculado com consórcio e exposto à luz). Abaixo estão descritos os tratamentos e os mecanismos avaliados e a Figura 2 ilustra esses tratamentos.

Tratamento 1: Efluente inoculado com consórcio microalgas-bactérias e exposto à luz.

Este tratamento avalia a atividade fotoautotrófica dos microrganismos presente no meio.

Tratamento 2: Efluente inoculado com consórcio microalgas-bactérias e mantido no escuro. Este tratamento avalia a atividade heterotrófica dos microrganismos presentes no inóculo adicionado, sem a influência da luz.

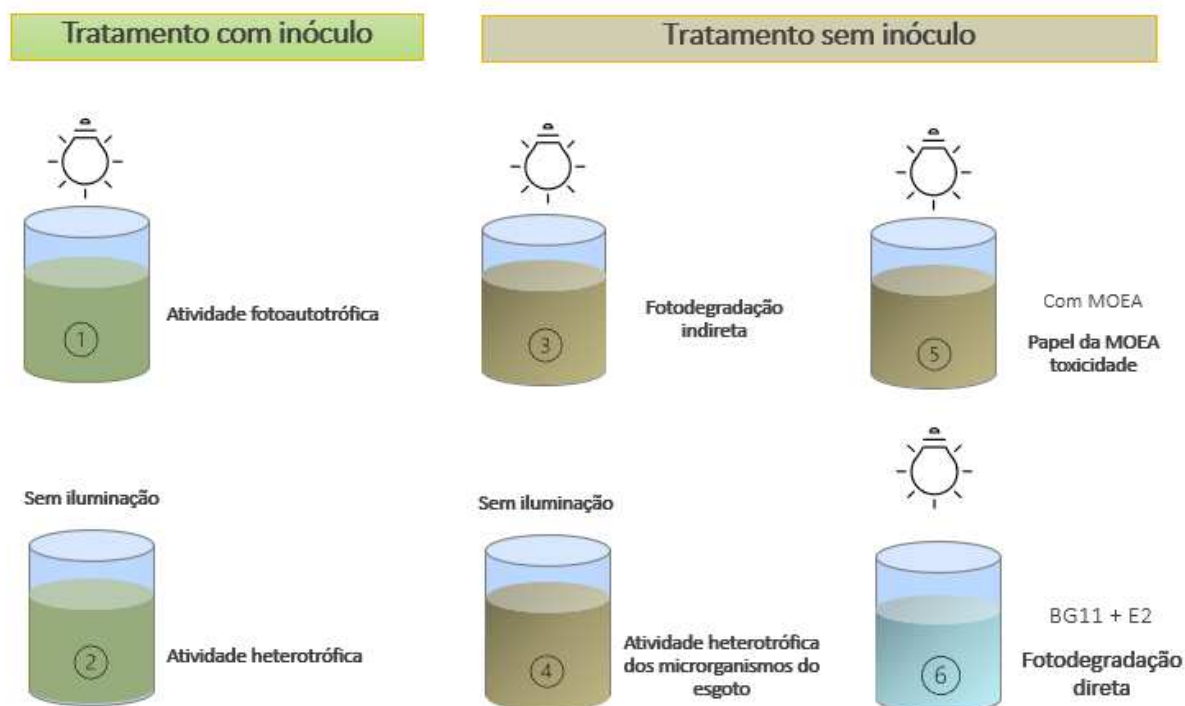
Tratamento 3: Efluente sem inóculo e exposto à luz. Este tratamento avalia a fotodegradação indireta dos compostos presentes no efluente.

Tratamento 4: Efluente sem inóculo e mantido no escuro. Este tratamento avalia a atividade heterotrófica dos microrganismos presentes no efluente.

Tratamento 5: Efluente com adição da MOE do consórcio e exposto à luz. Este tratamento verifica o papel da MOE do inóculo na remoção de toxicidade.

Tratamento 6: Meio BG11 autoclavado com adição de E2 e exposto à luz. Este tratamento avalia a fotodegradação direta ou induzida pelo meio BG11 na remoção de atividade estrogênica.

Figura 2 – Representação gráfica dos tratamentos utilizados para avaliação dos mecanismos de remoção de toxicidade e de atividade estrogênica do efluente (os tratamentos de 1 a 5 foram conduzidos com efluente do reator UASB, o tratamento 6 foi conduzido com meio BG11 autoclavado + E2).



Fonte: elaboração própria

5.2.8 Caracterização física e química

A caracterização física e química das amostras antes e após o tratamento foi realizada em triplicata, imediatamente após as coletas, de acordo com os procedimentos descritos no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) (APHA, 2022), conforme Tabela 1.

A análise de nitrogênio na forma de nitrato (N-NO_3^-) foi realizada com reagente Nitrover (Hach Company). Para análise de fósforo solúvel (P_{sol}), carbono total dissolvido (CTD), carbono orgânico dissolvido (COD), carbono inorgânico dissolvido (CID) e N-NO_3^- , as amostras foram filtradas em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ (ésteres de celulose) previamente lavadas

com água purificada. Para analisar sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV), utilizou-se filtro de fibra de vidro de porosidade 1,2 µm (FilterPro) e para análises de clorofila-a as amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,7 µm (Whatman GF/F). Densidade óptica (DO) por espectrofotometria foi medida a 680 nm.

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos para caracterização das amostras dos efluentes.

Parâmetro	Método
Alcalinidade	2320-B
Clorofila-a	10200 H
Carbono Orgânico Dissolvido	5310 B
Fósforo	4500-P D
Nitrogênio Amoniacal	4500-NH ₃ B, C
Nitrogênio Nitrato	4500-NO ₃ ⁻ E
Nitrogênio Total Kjeldahl	4500-N _{org} C
Oxigênio Dissolvido	4500-O G
pH	4500-H ⁺ B
Sólidos Suspensos Total, Fixo e Volátil	2540 D e E
Sulfeto	4500 S ²⁻ F

5.2.9 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda das amostras foi avaliada com o microcrustáceo *C. dubia*, de acordo com SMEWW (APHA, 2017) no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (Aquatox) situado no LESA. As amostras do efluente terciário foram centrifugadas a 2263 g por 3 minutos para retirada das células de microalgas antes de avaliar a toxicidade. O bioensaio foi conduzido de forma estática com duração de 2 dias. A água de cultivo dos organismos para o preparo de diluições foi coletada na saída dos filtros de areia (antes da etapa de desinfecção) da estação de tratamento de água da UFV, e sua dureza foi ajustada para 44 mg.L⁻¹ CaCO₃. As concentrações das amostras utilizadas no bioensaio foram de 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100% (soluções-teste) e as diluições foram preparadas em água de cultivo. Cada solução-teste continha 4 frascos com 15 mL e cinco neonatos de 6 a 24 h de vida. Os ensaios foram mantidos em incubadora com temperatura de 24±1°C, fotoperíodo de 12 h com luz difusa/12 h escuro e iluminância média de 700 lux com o uso de lâmpadas fluorescentes de cor branca. Quando necessário, o pH das amostras foi corrigido para 6,5 a 7,5 com o uso de solução de HCl 2:1. Os organismos não foram alimentados durante o teste.

Os resultados de sobrevivência nas amostras foram comparados com o controle para a obtenção da CL_{50} , concentração em que se observa efeito de mortalidade em 50% dos organismos. Para isso, foram empregados os métodos de *Spearman-Karber* com o uso do *software Comprehensive Environmental Toxicity Information SystemTM* (CETIS, Tidepool Scientific, McKinleyville, CA, EUA).

5.2.10 Toxicidade crônica

O ensaio crônico com *C. dubia* foi executado de acordo com a norma brasileira NBR 13373/2022 (ABNT, 2022). O teste foi conduzido de forma semi-estática, com renovação das soluções-teste a cada 48 h, e duração de sete dias. As concentrações das amostras foram de 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100% e as diluições foram preparadas em água de cultivo. Cada solução-teste continha 10 frascos com 15 mL e um neonato de 6 a 24 h de vida. Os ensaios foram mantidos na incubadora nas mesmas condições do teste de toxicidade aguda. A alimentação dos organismos foi realizada diariamente com uma suspensão algácea da microalga *Raphidocelis subcapitata* (2×10^5 células/organismo) cultivada no Aquatox.

Os adultos sobreviventes e os neonatos produzidos foram quantificados a cada renovação do meio e ao final do tempo de exposição. Os resultados de sobrevivência e reprodução nas amostras foram comparados com o controle para a obtenção da CL_{50} ou CE_{50} , concentração que afeta a capacidade de reprodução em 50% dos organismos, juntamente do intervalo de confiança (IC_{95}). Para isso, foram empregados os métodos de *Spearman-Karber* e interpolação linear com o uso do software CETIS.

As amostras foram classificadas de acordo com sua toxicidade, com base nos valores médios de CL_{50} ou CE_{50} , utilizando uma escala de toxicidade relativa modificada, como segue: CL_{50} (ou CE_{50}) < 25% (v/v), extremamente tóxico; $25\% \leq CL_{50} \leq 50\%$ altamente tóxico; $51\% \leq CL_{50} \leq 75\%$, moderadamente tóxico e $CL_{50} > 75\%$, levemente tóxico (Bulich, 1982; Düpont e Lobo, 2012).

5.2.11 Atividade estrogênica

A atividade estrogênica nas amostras foi determinada pelo ensaio *in vitro* YES, de acordo com a metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996), com modificações. As análises foram realizadas no LESA. Uma alíquota da cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada por J. P. Sumpter da Universidade de Brunel, Uxbridge, Reino Unido, foi cedida pela D. Sc. Daniele Maia Bila, professora do Departamento de

Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ) e cultivada no LESA.

Os micropoluentes apolares presentes nas amostras foram concentrados em cartuchos Strata-X de 500 mg com capacidade de 6 mL (Phenomenex®), pela técnica de extração em fase sólida, após ajuste do pH das amostras para 3 com HCl concentrado. Os cartuchos foram previamente condicionados passando-se 3 x 2 mL de hexano, 1 x 2 mL de acetona, 2 x 3 mL de metanol e, por último, lavados com 5 x 2 mL de água purificada (Sistema Osmose Reversa, Gehaka Linha LXE) com pH ajustado para 3. Duas filtrações prévias de 100 mL das amostras foram feitas em membranas de fibra de vidro de 0,7 µm (Whatman GF/F) e de nylon de 0,45 µm (Merck Millipore). Foram analisadas as atividades estrogênicas da fase dissolvida (< 0,45 µm), dos sólidos entre 0,45 e 0,7 µm, e dos sólidos maiores que 0,7 µm. Para análise da atividade estrogênica do material particulado, as membranas foram submetidas à extração ultrassônica com solvente, que consistiu em três ciclos de 10 min com 20 mL de metanol. Os extratos foram diluídos com água purificada para 200 mL e seguiu-se com a etapa de extração (Argolo; Gomes; Bila, 2023).

A extração foi realizada por gotejamento contínuo, em velocidade aproximadamente de 2 mL.min⁻¹, mantendo sempre uma película do líquido acima da fase sólida do cartucho a fim de evitar o ressecamento dos poros e conseqüente perda do analito. Após a extração, o extrato foi eluído passando-se 4 x 1 mL de acetona pelo cartucho e coletando-a em tubos de ensaio. A acetona foi totalmente volatilizada em duas etapas: temperatura ambiente e fluxo de nitrogênio gasoso; em seguida, os tubos de ensaio foram congelados a - 21±1°C. No momento da realização do ensaio YES, os analitos foram reconstituídos em 1 mL de etanol grau HPLC.

O ensaio foi realizado em câmara de fluxo laminar, em microplacas estéreis de 96 poços, com fundo chato e tampa. Inicialmente, foram preparadas, também em microplacas de 96 poços, 12 diluições seriadas 1:1 das amostras reconstituídas e da curva padrão, ambas em etanol absoluto. A curva foi feita a partir de uma solução-padrão de E2 (54,48 µg.L⁻¹). Após o preparo das diluições, 10 µL dos extratos diluídos foram transferidos em duplicata para o poço correspondente da placa de análise, intercalados com controles negativos. Após a evaporação completa dessa alíquota, adicionaram-se 200 µL do meio de análise contendo meio de cultivo, *Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside* (CPRG) na concentração de 100 mg.L⁻¹ e 1,3 x 10⁶ cel.mL⁻¹ de levedura. As concentrações finais nos poços da curva foram de 1,3 a 2.724 ng.L⁻¹ de E2.

As placas foram fechadas, suas laterais envolvidas com fita crepe, agitadas por 2 minutos em agitador de placas de 96 poços (K40-10208, KASVI) e incubadas por 6 dias em estufa aquecida a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Ao final do tempo de incubação, as placas foram novamente agitadas e deixadas em repouso por 1 h, até o momento da leitura. As absorvâncias foram determinadas em leitora de microplacas (Polaris, Celer®) nos comprimentos de onda de 540 nm correspondente à cor desenvolvida pela atividade da enzima β -galactosidase, e 630 nm utilizada para correção da turbidez associada ao crescimento da levedura. Para o cálculo do equivalente de E2 nas amostras, foi primeiro, subtraída a absorvância da turbidez de cada poço da placa pela média da absorvância dos poços do branco correspondentes. Em seguida, esse valor foi subtraído da absorvância da cor de cada poço (a 540 nm), conforme a Equação 1:

$$\text{Abs}_{\text{corrigida Amostra}} = \text{Abs}_{540 \text{ Amostra}} - (\text{Abs}_{630 \text{ Amostra}} - \text{Abs}_{630 \text{ Branco}}) \quad \text{Equação 1}$$

A curva dose-resposta da solução-padrão de 17β -estradiol foi construída relacionando-se os valores de absorvância corrigida em função da concentração, expresso em ng.L^{-1} . Os valores de CE_{50} do 17β -estradiol foram determinados a partir de sua curva dose-resposta juntamente dos demais parâmetros da regressão sigmoidal (Equação 2). O valor de CE_{50} correspondeu à concentração que elucidou 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase em relação à curva padrão. Para esse cálculo utilizou-se o programa OriginPro (OriginLab, Northhampton, EUA).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad \text{Equação 2}$$

em que: y é o valor de $\text{Abs}_{\text{corrigida}}$;

A_1 é a mínima indução da atividade estrogênica;

A_2 é a máxima indução da atividade estrogênica;

x é a concentração da substância estrogênica no ensaio;

x_0 é a CE_{50} do 17β -estradiol, e

p é a inclinação da região mediana da parte linear da curva dose-resposta.

Com os valores dos parâmetros da regressão, calculou-se o valor da atividade estrogênica (ajuste sigmoidal) em cada uma das 12 diluições na placa de teste referente à amostra pela Equação 3 (reorganizada da Equação 2):

$$x = CE_{50} \left(\frac{A_1 - A_2}{y - A_2} - 1 \right)^{\frac{1}{p}} \quad \text{Equação 3}$$

Em seguida, pela Equação 4, calculou-se o equivalente de estradiol (Eq-E2), no primeiro poço, considerando os volumes utilizados na extração das amostras (100 mL), na reconstituição no momento do ensaio (1 mL) e dos volumes utilizados na placa de análise (10 µL). Nos poços subsequentes (2 a 12), a mesma equação foi utilizada, e os resultados foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes à diluição seriada 1:1 de cada poço.

$$Eq E_2 \left(\frac{ng}{L} \right) = x \cdot \frac{1 mL}{100 mL} \cdot \frac{200 \mu L}{10 \mu L} \quad \text{Equação 4}$$

Na etapa seguinte, para cada amostra, um gráfico foi construído com os valores da absorbância corrigida em função das concentrações calculadas pelo ajuste sigmoidal. Por fim, calculou-se a atividade estrogênica pela média da região linear desse gráfico.

5.2.12 Análise estatística

Para verificar diferenças estatísticas significativas entre os ensaios de toxicidade foi utilizado o tratamento estatístico apresentado na Equação 5 (Zagatto; Bertolotti, 2006). Essa equação considera o intervalo de confiança superior e os índices de CE₅₀ e CL₅₀ dos ensaios que se deseja comparar.

Primeiramente, calcula-se o índice estatístico G:

$$G = \sqrt{\left(\log \left(\frac{UL_{(1)}}{CE_{50(1)}} \right) \right)^2 + \left(\log \left(\frac{UL_{(2)}}{CE_{50(2)}} \right) \right)^2} \quad \text{Equação 5}$$

em que:

UL₍₁₎ = intervalo de confiança superior para o teste 1;

UL₍₂₎ = intervalo de confiança superior para o teste 2;

CE₅₀₍₁₎ = concentração efetiva para o teste 1;

CE₅₀₍₂₎ = concentração efetiva para o teste 2.

Em seguida, aplicam-se as seguintes fórmulas:

$$H = 10^G$$

$$Z = \frac{CE50 \text{ maior}}{CE50 \text{ menor}}$$

Se Z > H, há diferença significativa entre os valores de CE₅₀ ou CL₅₀.

Para verificar diferenças estatísticas significativas entre os resultados dos testes estrogênicos, foram realizadas análises estatísticas utilizando o software Jamovi Project (versão 2.5). Um teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a distribuição normal das medidas. Após verificação dos pressupostos de normalidade, foram realizados análise de variância (ANOVA) e testes Post Hoc de Tukey com confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). O teste de Levine foi utilizado para testar a homogeneidade de variância.

5.3 Resultados e Discussão

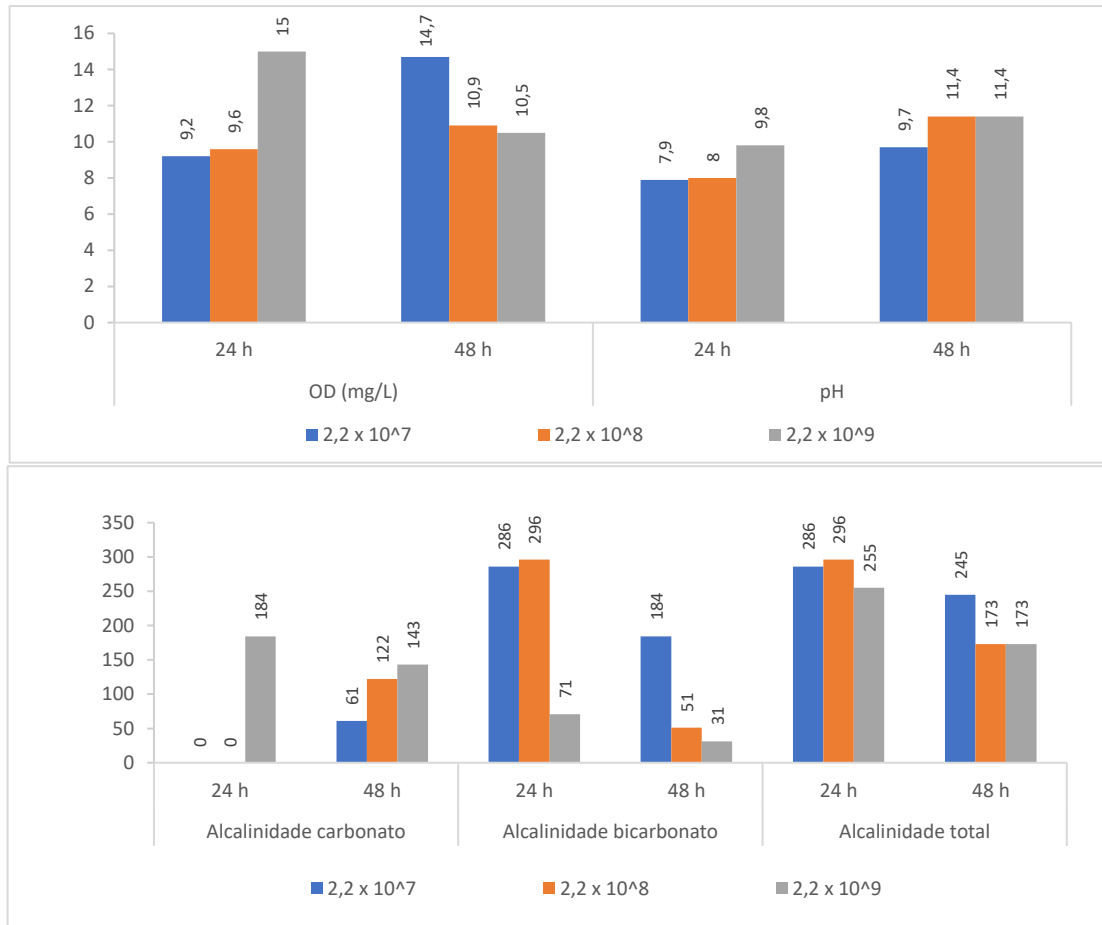
5.3.1 Toxicidade a *Ceriodaphnia dubia*

5.3.1.1 Seleção de densidade microalgal

No experimento em que foi realizado o tratamento do efluente do reator UASB com diferentes densidades algais, os microrganismos dominantes no inóculo foram a bactéria *Pseudomonas putida* (53,6% das leituras) e a microalga verde *Acutodesmus obliquus* (94% das leituras). Observou-se diminuição da alcalinidade total nos três fotobiorreatores. Nas primeiras 24 h de tratamento, no sistema de maior densidade celular, ocorreu aumento do pH devido ao consumo de CO₂ na forma de bicarbonatos presentes no meio, o que causou a diminuição da alcalinidade bicarbonato e o aumento da alcalinidade na forma de carbonatos. Após 48 h de tratamento, comportamento similar foi observado nos demais fotobiorreatores, sendo que no sistema com menor densidade algal, ao final das 48 h, permaneceu maior alcalinidade na forma de bicarbonatos. Esse comportamento, bem como o consumo de CO₂ na forma de carbono inorgânico nos três fotobiorreatores, são apresentados nas Figuras 3 e 4.

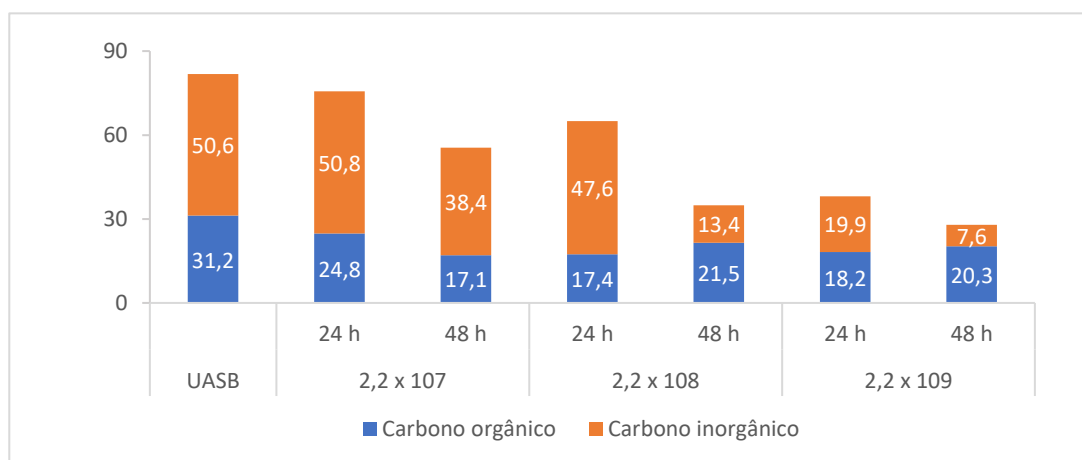
A maioria das espécies de microalgas é favorecida pelo pH neutro, mas algumas são tolerantes a sistemas ácidos ou alcalinos (Gonçalves; Pires; Simões, 2017). Há uma relação complexa entre a concentração de CO₂ e o pH em sistemas de tratamento com microalgas, devido aos equilíbrios químicos entre CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ e CO₃²⁻. O consumo de CO₂ pode provocar aumento no pH do sistema para 10,0 a 11,0, o que pode inibir o crescimento de algumas microalgas, liberar NH₃ para a atmosfera, e ao mesmo tempo, causar efeito benéfico de inativação de patógenos.

Figura 3 – Valores de OD (mg.L^{-1}), pH e alcalinidade ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$) dos efluentes dos fotobiorreatores inoculados com diferentes densidades microalgais (cel.L^{-1}) no tratamento do efluente do reator UASB.



Fonte: elaboração própria

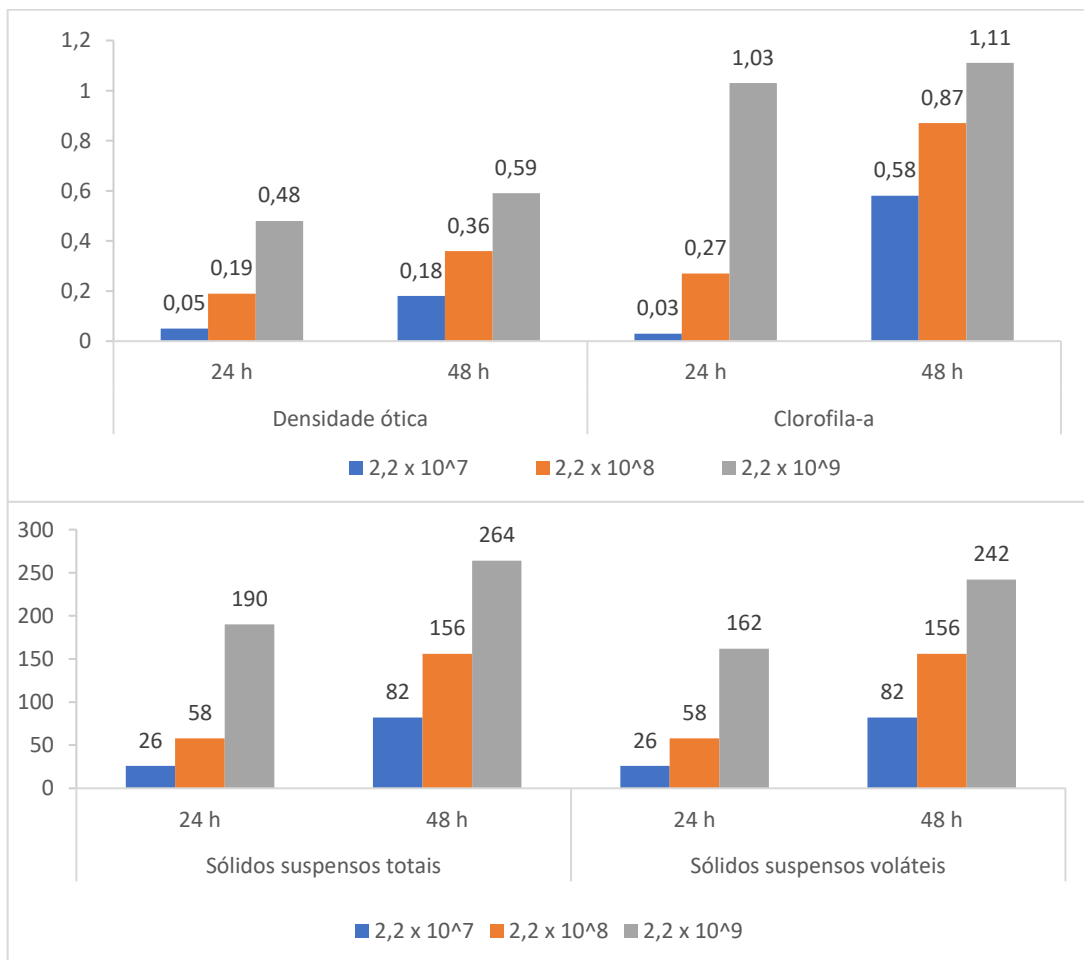
Figura 4 – Valores de carbono dissolvido, em mg.L^{-1} , em 24 e 48 h nos reatores inoculados com diferentes densidades microalgais.



Fonte: elaboração própria

A clorofila-a é uma das principais clorofilas das microalgas, e sua concentração está relacionada ao nível de atividade dos cloroplastos, à taxa de fotossíntese e ao teor de biomassa das microalgas (Li *et al.*, 2022). Esse parâmetro foi usado como indicador de crescimento de microalgas nos sistemas. Após 48 h de tratamento, a clorofila-a no fotobiorreator, contendo inicialmente $2,2 \times 10^7$ cel.L⁻¹, aumentou 95% em relação a 24 h de tratamento. Ao mesmo tempo, o aumento de clorofila-a nos fotobiorreatores de $2,2 \times 10^8$ e $2,2 \times 10^9$ cel.L⁻¹ em relação ao encontrado após 24 h, foi de 69% e 7%, respectivamente. Comportamento similar pode ser observado pelo desenvolvimento do consórcio microalgas-bactérias avaliados por DO e SSV (Figura 5). O maior crescimento das microalgas nos dois fotobiorreatores com maior densidade algal ocorreu durante as primeiras 24 h de tratamento, o que também pode ser observado pelo aumento na concentração de OD (Figura 3).

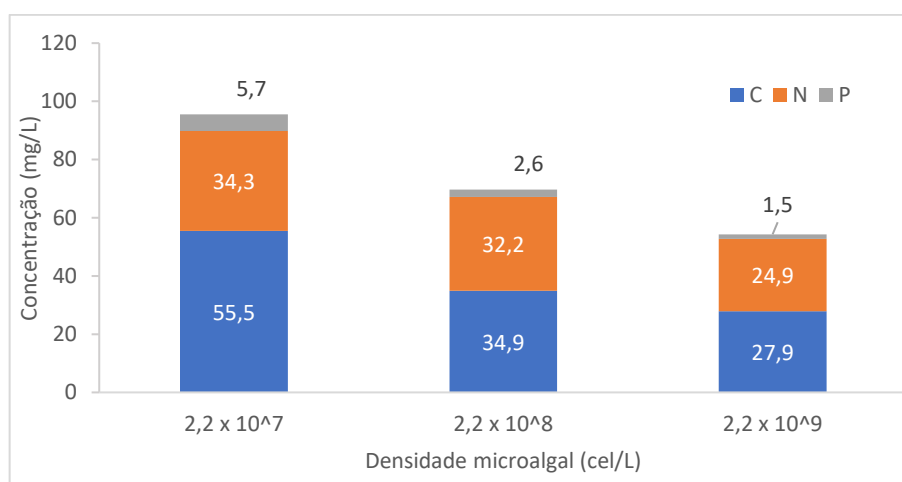
Figura 5 – Valores de DO a 680 nm, SST, SSV e clorofila-a (mg.L⁻¹) em 24 e 48 h nos reatores inoculados com diferentes densidades microalgais.



Fonte: elaboração própria

A proporção C:N:P de 13:7:1 no efluente do reator UASB difere da proporção ideal (2,5:1,8:1) para o crescimento de *Scenedesmus obliquus* (*Acutodesmus obliquus*) reportada por Shashirekha; Sivakumar; Seshadri (2016). No efluente do reator, havia maior disponibilidade de C e N em relação ao P, comparado ao estudo de referência. Após 48 horas de tratamento, as proporções C:N:P nos Sistemas 1 (10:6:1), 2 (13:12:1) e 3 (19:17:1) indicaram um aumento relativo das concentrações de C e N nos sistemas com maior densidade algal (Figura 6). Esse padrão sugere possível excesso desses nutrientes e limitação de P, condição que pode comprometer o metabolismo equilibrado da microalga. Carbono, nitrogênio e fósforo são os principais nutrientes para o crescimento de microalgas: o carbono inorgânico é o precursor de reações fotossintéticas, enquanto nitrogênio e fósforo são necessários para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. A presença desses nutrientes em concentrações limitantes pode levar à redução da taxa de crescimento e da produtividade de biomassa (Gonçalves; Pires; Simões, 2017).

Figura 6 – Concentrações finais (mg.L^{-1}) de carbono total solúvel (C), nitrogênio nas formas de íon amônio e nitrato (N) e fósforo solúvel (P), após 48 h de tratamento nos reatores inoculados com diferentes densidades microalgais.



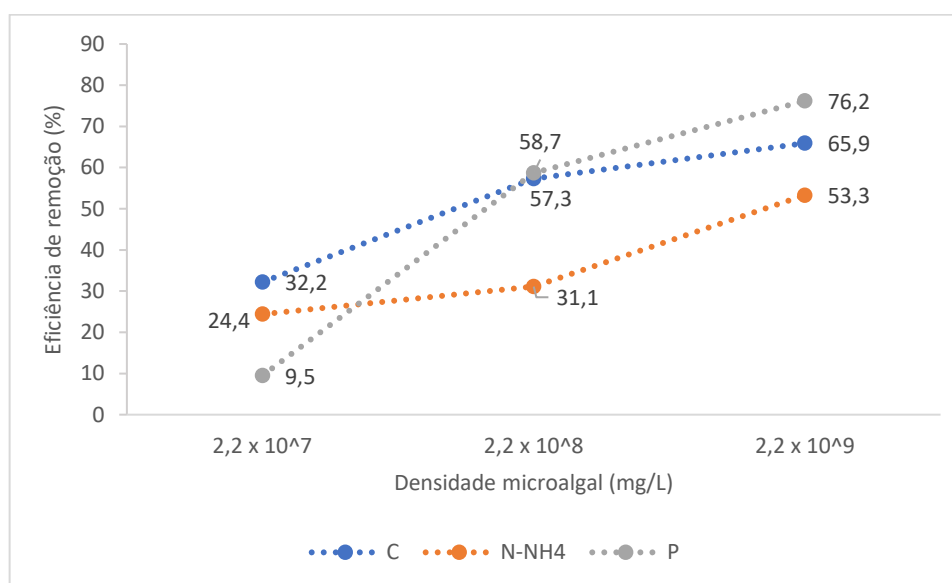
Fonte: elaboração própria

Em todos os tratamentos ocorreu a diminuição de carbono orgânico dissolvido inicial, pelo consumo por microrganismos presentes no meio (Figura 4). A eficiência de remoção de fósforo solúvel após 48 h foi de 9% no primeiro sistema, 59% no segundo e 76% no terceiro (Figura 7). O fósforo entra nas células microalgais por meio do transporte ativo na membrana plasmática nas formas de H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , que podem ser incorporados a compostos orgânicos, como DNA, RNA e lipídios por fosforilação (Liu, Junzhuo *et al.*, 2017). A remoção de fósforo

também pode ocorrer por condições ambientais, como pH e concentração de OD. Para valores de pH acima de 8,0 e altas concentrações de oxigênio, pode ocorrer a precipitação de fósforo (Gonçalves; Pires; Simões, 2017).

A remoção de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺) pelo consórcio microalgas-bactérias foi de 24%, 31% e 53% nos sistemas 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 7). Parte desse nitrogênio foi incorporada pelas microalgas, causando aumento de nitrogênio orgânico total (Tabela 2). Durante o crescimento microbiano, a assimilação é o principal mecanismo de remoção de nitrogênio inorgânico na forma de íon amônio. (Gonçalves; Pires; Simões, 2017). Logo após a assimilação, o nitrogênio incorporado pelas células é diretamente convertido em aminoácidos (Gonçalves; Pires; Simões, 2017). Além da assimilação, a remoção de amônio pode ocorrer por volatilização de gás amônia em pH alto (> 8,0) (Liu, Junzhuo *et al.*, 2017).

Figura 7 – Eficiência de remoção (%) de carbono total solúvel (C), íon amônio (N-NH₄⁺) e fósforo solúvel (P), após 48 h de tratamento nos reatores inoculados com diferentes densidades microalgais.



Fonte: elaboração própria

Tabela 2 – Concentrações de fósforo solúvel e das formas de nitrogênio do efluente secundário e dos efluentes terciários após 48 h de tratamento nos reatores inoculados com diferentes densidades de microalgas.

Parâmetro	Efluente UASB	2,2 x 10 ⁷ cel.L ⁻¹	2,2 x 10 ⁸ cel.L ⁻¹	2,2 x 10 ⁹ cel.L ⁻¹
P solúvel (mg.L ⁻¹)	6,3	5,7	2,6	1,5
N _{org} (mg.L ⁻¹)	8,0	21	19	30
N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	45	34	31	21
N-NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0,6	0,3	1,2	3,9

A CL_{50} do efluente do reator UASB foi de 33,0% com intervalo de confiança entre 30,1 e 36,2%, sendo essa concentração classificada como altamente tóxica aos organismos aquáticos ($25\% \leq CL_{50} \leq 50\%$). Resultados similares de toxicidade aguda foram registrados em estudos anteriores com embriões de *Danio rerio* (peixe-zebra) e *Daphnia magna* (Düpont; Lobo, 2012; Lutterbeck *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021). Após 24 h de tratamento no sistema com menor densidade algal, a toxicidade aguda do esgoto foi reduzida pela metade, e ao final de 48 h de tratamento, o efluente do fotobiorreator não apresentou toxicidade aos organismos Tabela 3. O mesmo comportamento foi verificado para o sistema com $2,2 \times 10^8$ cel.L⁻¹, com desempenho um pouco melhor nas primeiras 24 h (55% de remoção). Mesmo assim, o efluente é classificado como moderadamente tóxico. Por sua vez, o tratamento com maior densidade algal foi capaz de remover toda a toxicidade do esgoto após 24 h de tratamento, ou seja, não causou a mortalidade dos organismos expostos.

Como as células de microalgas incorporam nitrogênio amoniacal (ou contribuem na volatilização devido ao aumento de pH do meio), que pode ser tóxico para *C. dubia* na sua forma livre (NH₃), a redução na toxicidade pode ser relacionada a diminuição desse parâmetro. Da mesma forma, a diminuição de carbono e compostos com atividade estrogênica, como para-fenilfenol, podem reduzir a toxicidade a *C. dubia* e *D. magna* (Cho *et al.*, 2022; Raptis; Juraske; Hellweg, 2014).

Tabela 3 – Toxicidade aguda dos efluentes após 24 h e 48 h de tratamento em fotobiorreatores contendo diferentes densidades algais iniciais. (Valores de CE_{50} e, entre parênteses, de IC_{95} , ambos em %).

Densidade algal inicial, cel.L ⁻¹	24 h	48 h
$2,2 \times 10^7$	65,8 (59,8 – 72,3)	Não tóxico
$2,2 \times 10^8$	73,8 (67,1 – 81,2)	Não tóxico
$2,2 \times 10^9$	Não tóxico	

Ao avaliar os resultados de toxicidade com diferentes densidades algais e considerar que a densidade celular de $2,2 \times 10^8$ cel.L⁻¹ foi correspondente à proporção de 10% (v/v) de inóculo/esgoto, comumente utilizada nos tratamentos com consórcio microalgas-bactérias (Braga *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2023), foi definida essa densidade para os experimentos subsequentes.

5.3.1.2 Mecanismos de remoção de toxicidade aguda

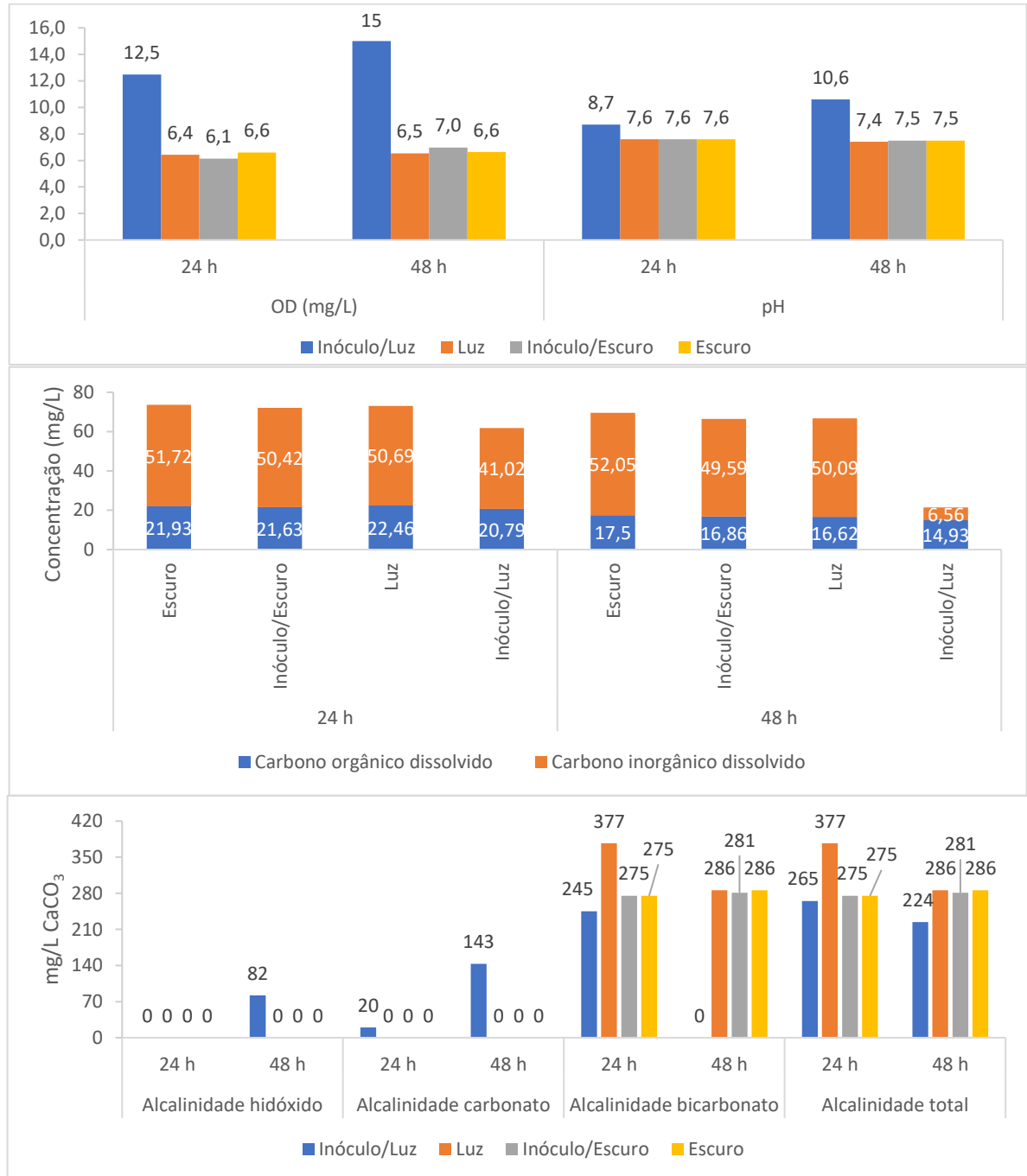
Nos experimentos para avaliar os mecanismos de remoção de toxicidade aguda do efluente do reator UASB, os microrganismos dominantes no inóculo foram a bactéria *Pseudomonas putida* (53,6% das leituras) e a microalga verde *Acutodesmus obliquus* (94% das leituras). Os tratamentos foram: efluente/luz, efluente/escuro, efluente/inóculo/luz e efluente/inóculo/escuro. A CL₅₀ do efluente do reator UASB foi igual a 37,35% (IC₉₅, 33,89 - 41,15%), mantendo a classificação de altamente tóxico. A caracterização física e química do efluente é apresentada na Tabela 4. A sensibilidade dos organismos-teste foi determinada pelo emprego da substância de referência NaCl. A CL₅₀ foi de 1,36 g.L⁻¹ com IC₉₅ de 1,21 a 1,53 g.L⁻¹, resultado consistente com os ensaios anteriores do Aquatox.

Tabela 4 - Caracterização física e química do efluente do reator UASB usado nos fotobiorreatores expostos aos tratamentos com e sem inóculo e com e sem iluminação.

Parâmetro	Valor (mg.L⁻¹)
Alcalinidade total	286
COD	23,3
CID	54,5
CTD	77,8
P total	6,3
P _{sol}	5,0
N _{org}	5,0
N-NH ₄ ⁺	52
N-NO ₃ ⁻	0,6

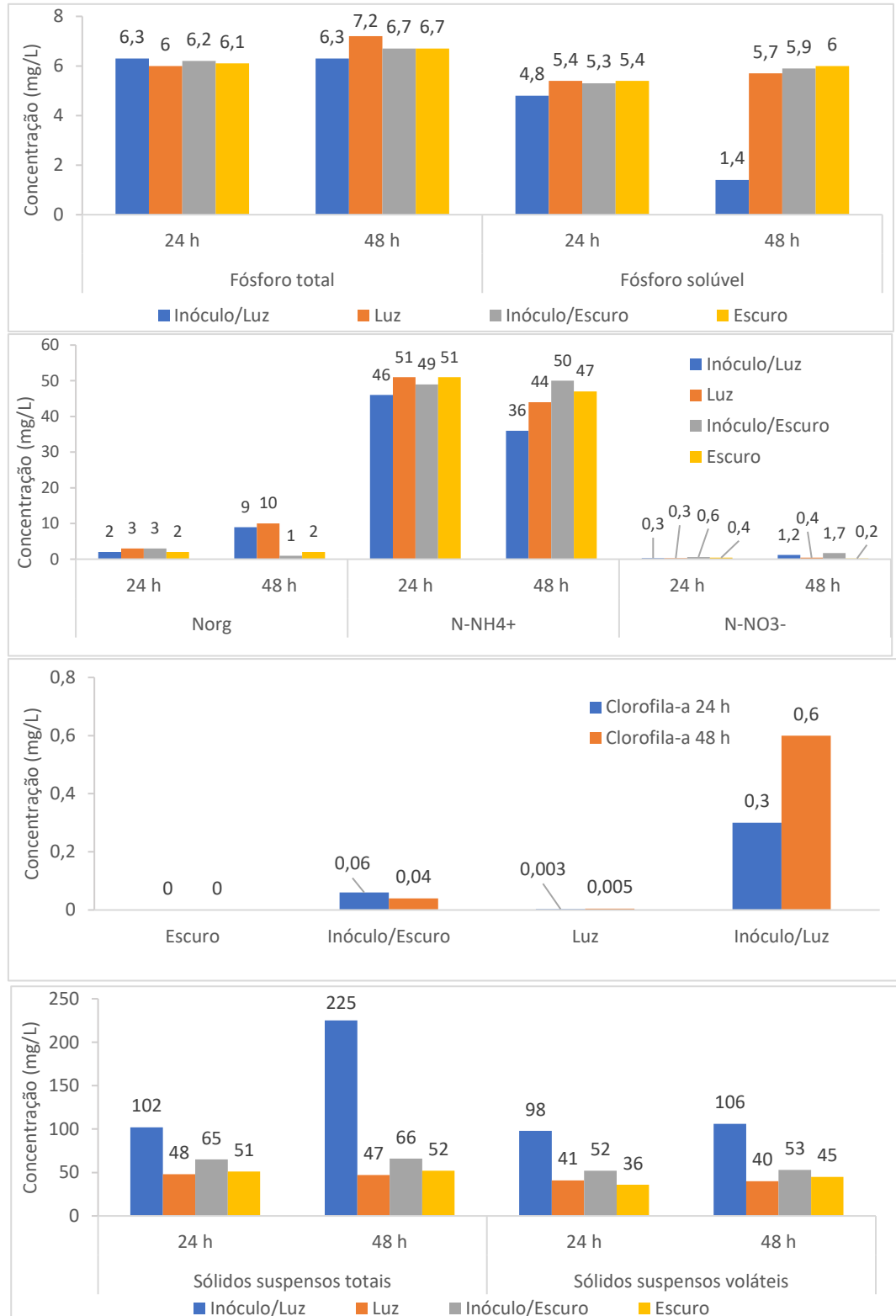
Ocorreram pequenas modificações nos parâmetros físicos e químicos ao longo do tempo em três dos quatro tratamentos, com exceção do fotobiorreator contendo o consórcio microalgas-bactérias e exposição à luz. Esse apresentou comportamento similar ao do experimento anterior (item 5.3.1.1): consumo de carbono inorgânico e nutrientes, aumento de pH, OD, SSV e clorofila-a (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Valor de pH e concentrações de OD, COD e CID (mg.L⁻¹), alcalinidade (mg.L⁻¹ de CaCO₃) dos efluentes dos fotobiorreatores expostos aos tratamentos com e sem inóculo e com e sem iluminação para análise dos mecanismos de remoção de toxicidade aguda e atividade estrogênica do efluente do reator UASB.



Fonte: elaboração própria

Figura 9 –Concentrações de fósforo, das formas de nitrogênio, clorofila-a e sólidos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dos efluentes dos fotobiorreatores expostos aos tratamentos com e sem inóculo e com e sem iluminação para análise dos mecanismos de remoção de toxicidade aguda e atividade estrogênica do efluente do reator UASB.

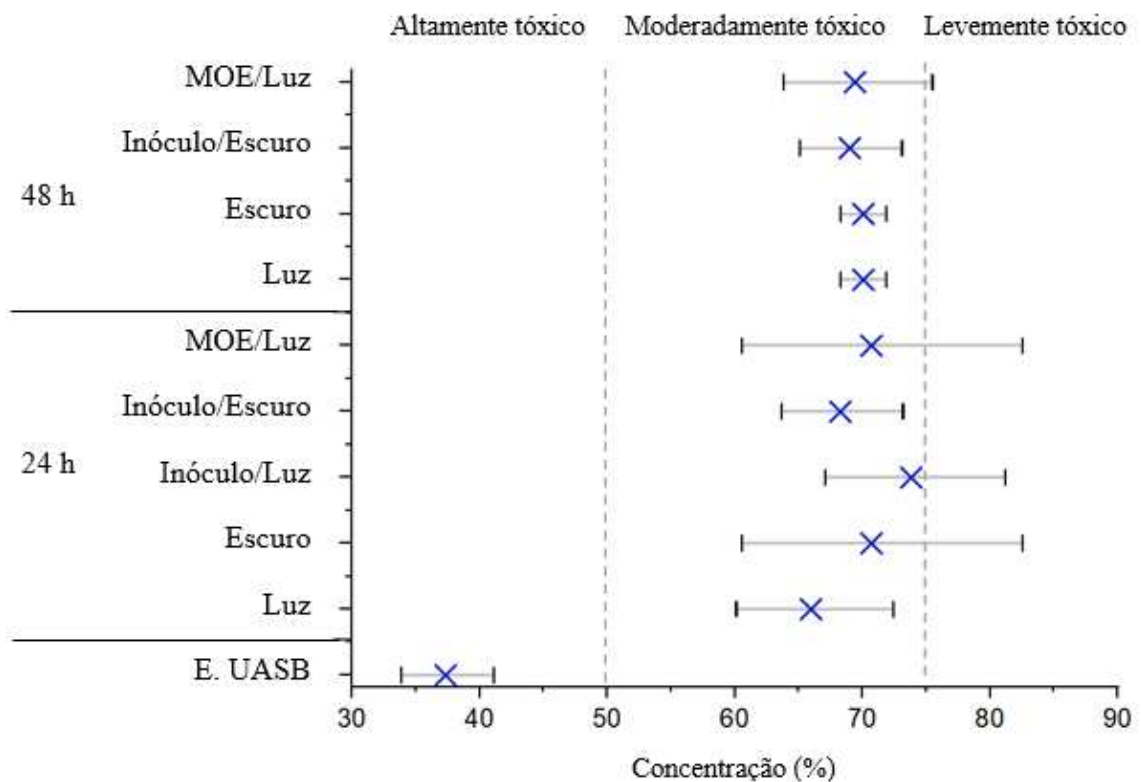


Fonte: elaboração própria

Após 24 h de tratamento, todos os tratamentos expostos a diferentes condições (com e sem iluminação e/ou inóculo) apresentaram redução de toxicidade, com CL_{50} entre 66 e 74%, sendo classificados como moderadamente tóxicos (Figura 10). Após 48 h de tratamento, os efluentes permaneceram com a mesma toxicidade, exceto o do sistema com inóculo e exposição à luz, em que o tratamento com o consórcio microalgas-bactérias removeu a toxicidade.

Para verificar o papel da MOE do inóculo na remoção de toxicidade foram conduzidos experimentos com MOE na proporção de 10% (v/v), o que correspondeu a $1,44 \text{ mg.L}^{-1}$ de COD. A CL_{50} após 24 h de tratamento foi igual a 70,7% (IC_{95} , 60,6 - 82,6%), e após 48 h, igual a 69,4% (IC_{95} , 63,8 - 75,5%). O resultado não se diferenciou dos demais tratamentos (Apêndice, Tabela S2).

Figura 10 - CL_{50} e IC_{95} dos ensaios de toxicidade aguda dos efluentes dos reatores expostos aos tratamentos com e sem inóculo e com e sem iluminação para análise dos mecanismos de remoção de toxicidade aguda do esgoto do reator UASB.



O tratamento Inóculo/Luz não apresentou toxicidade após 48 h, por esse motivo, não está representado no gráfico.

Fonte: elaboração própria

Baseado nos resultados apresentados, pode-se inferir que a atividade de microrganismos heterotróficos presentes no próprio efluente e observada pelo consumo de COD nos tratamentos (Figura 8) foi responsável pela redução de quase metade da toxicidade do esgoto em condições aeróbias após 24 h. Ademais, após 48 h, somente o tratamento com consórcio e exposição à luz foi capaz de remover toda a toxicidade do esgoto por meio da atividade fotoautotrófica.

Deve-se considerar, também, a toxicidade possivelmente provocada por gases dissolvidos, como por exemplo, sulfeto de hidrogênio e amônia. A volatilização desses gases, bastante tóxicos, pode ser responsável pela redução de toxicidade nos tratamentos sem inóculo. No entanto, nas primeiras 24 h de tratamento, apesar da redução de toxicidade, não ocorreu redução de nitrogênio amoniacal nos sistemas (49 a 51 mg.L⁻¹) e mesmo com redução de 23% de sulfeto, a concentração restante, 9,8 mg.L⁻¹, ainda é tóxica para organismos aquáticos de nível trófico superior, como embriões de peixe-zebra (CL₅₀, 6,5 mg.L⁻¹) (Wu, Lingling *et al.*, 2016). Por se tratar de uma matriz complexa, para identificar os agentes responsáveis pela toxicidade do esgoto é necessário um estudo específico de avaliação e identificação de toxicidade, o que não é o foco deste estudo.

5.3.1.3 Toxicidade crônica

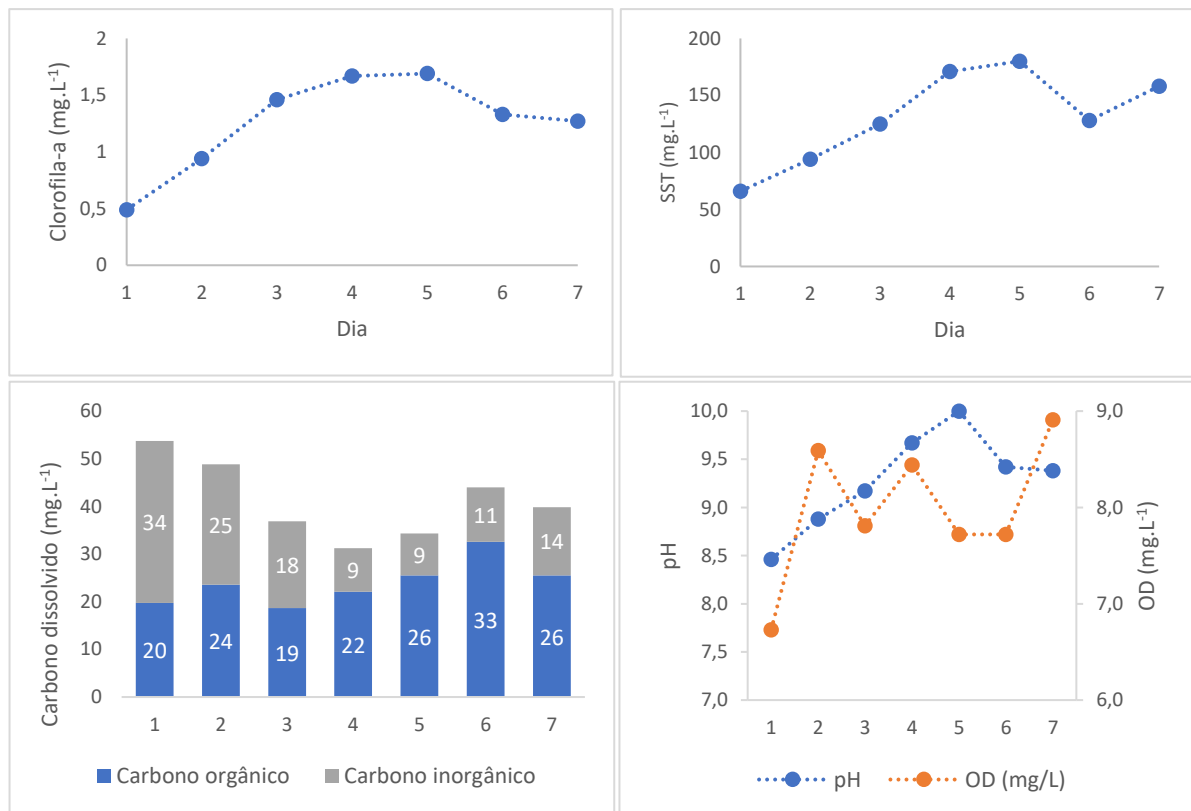
Os microrganismos dominantes no inóculo utilizado nos experimentos de remoção de toxicidade crônica foram as bactérias *Bacillus cereus* (28,7% das leituras) e *Brevundimonas kwagchunensis* (14% das leituras) e a microalga verde *Chlorella sorokiniana* (75,1% das leituras).

Para avaliação da toxicidade crônica após 7 dias de tratamento, o experimento foi realizado em reator de 4 L, com coleta diária para análise de alguns parâmetros físicos e químicos. Houve crescimento da biomassa durante os cinco primeiros dias, uma queda no sexto dia um pequeno aumento ao final do tratamento. O mesmo comportamento foi observado para a clorofila-a produzida pelas microalgas (Figura 11). A produção final de clorofila-a foi de 1,27 mg.L⁻¹. Krustok *et al.* (2016), em experimentos realizados em reatores de 1 L com esgoto sanitário, registraram concentração de 1,6 mg.L⁻¹ de clorofila-a.

A concentração de N-NH₄⁺ no esgoto do reator UASB foi de 36 mg.L⁻¹, valor similar ao encontrado por outros autores (Vassalle *et al.*, 2020). A eficiência de remoção de N-NH₄⁺ foi de 96%. Houve aumento no nitrogênio orgânico, bem como a formação de nitrogênio na forma de nitrato (Tabela 6Tabela). Ao analisar os resultados pode-se dizer que a redução de N-NH₄⁺ foi devido, principalmente, à nitrificação. A remoção geral de nitrogênio nesse sistema não foi bem-sucedida, pois o fotobiorreator apenas proporcionou a oxidação de amônio em

nitrito. Esses resultados se diferenciaram dos experimentos anteriores (itens 6.3.1.1 e 6.3.1.2), possivelmente pela diferente composição do consórcio. Krustok *et al.* (2016) obtiveram eficiência de remoção de N-NH_4^+ acima de 99% com uso de inóculo com predomínio dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, e registraram a nitrificação como causa da rápida diminuição de N-NH_4^+ .

Figura 11 – Resultados diários de clorofila-a, SST, C, OD e pH no tratamento do esgoto do reator UASB em reator de 4 L com tempo de tratamento de 7 dias.



Fonte: elaboração própria

A concentração de P_{sol} foi de $5,1 \text{ mg.L}^{-1}$, similar aos valores dos experimentos dos itens 5.3.1.1 e 5.3.1.2, e a eficiência de remoção foi de 40%. Maiores remoções são reportadas em sistemas controlados, já em sistemas ao ar livre, as eficiências são dependentes das condições ambientais. Viruela *et al.* (2016) registraram remoções entre 36,1 e 77,9% em fotobiorreatores com TDH de 8 e 14 dias, alimentados com esgoto sanitário tratado por processo anaeróbico e expostos à luz solar entre os meses de setembro e dezembro, na Espanha. Como o pH não foi controlado neste estudo, e se manteve entre 8,5 e 10,0, é possível que a remoção de fósforo

solúvel tenha ocorrido por assimilação na biomassa, ou principalmente, por precipitação química, já que o fósforo tende a precipitar em condições alcalinas (Young, P.; Taylor; Fallowfield, 2017).

Tabela 6 - P_{sol} , N_{org} , $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$ no efluente do reator UASB e do efluente do reator de 4 L no tratamento com tempo de 7 dias.

Amostra	P_{sol} (mg.L ⁻¹)	N_{org} (mg.L ⁻¹)	$N-NH_4^+$ (mg.L ⁻¹)	$N-NO_3^-$ (mg.L ⁻¹)
Efluente reator UASB	5,1	4,0	36,0	1,6
Efluente fotobiorreator	3,0	16,0	< 1,5	39

Os resultados de toxicidade nesse sistema mostram que o esgoto do reator UASB foi novamente classificado como altamente tóxico, com CL_{50} de 47% (IC_{95} , 38% - 58%), com efeito agudo nas concentrações de 50 e 100% no segundo dia de teste. O efluente do fotobiorreator não apresentou efeito tóxico sobre a sobrevivência de *C. dubia*. Matamoros et al. (2015) também reportaram a remoção de toxicidade aguda à *D. magna* após tratamento em LATs.

A CE_{50} do esgoto do reator UASB foi de 39% (IC_{95} , 35% - 44%) e do fotobiorreator foi de 32% (IC_{95} , 28% - 34%). Pela análise do resultado das duas amostras por meio do tratamento estatístico proposto por Zagatto e Bertolotti (2006), é possível afirmar que houve diferença estatística significativa na reprodução, sendo o efluente do fotobiorreator mais tóxico do que o esgoto do reator UASB ($H = 1,14$ e $Z = 1,22$). Essa diferença ocorreu nas soluções-teste de 50% (efluente/ água de diluição), em que a reprodução no efluente secundário foi de 6 organismos e no efluente terciário foi de apenas 1 organismo. A concentração de inibição a 25% dos organismos (CI_{25}) foi de 24% (IC_{95} , 19% a 27%) no efluente do fotobiorreator e de 31% (IC_{95} , 26% a 33%) no esgoto do reator UASB.

O maior efeito sobre a reprodução do efluente do fotobiorreator pode ser devido aos efeitos sinérgicos e aditivos de componentes físicos, químicos e biológicos presentes na amostra. A alta concentração de nitrato presente no efluente final pode ser um dos agentes. Baker *et al.* (2017) avaliaram a toxicidade de $N-NO_3^-$ em diversas espécies de organismos aquáticos e notaram que *C. dubia* foi a mais sensível em todos os testes, com valores de CI_{25} variando de 13,8 a 47,5 mg.L⁻¹ à medida que a dureza da água aumentava de 44 para 166 mg.L⁻¹ de $CaCO_3$. A concentração de nitrato era ausente no efluente secundário, mas foi encontrada no efluente terciário em concentração de 39 mg.L⁻¹.

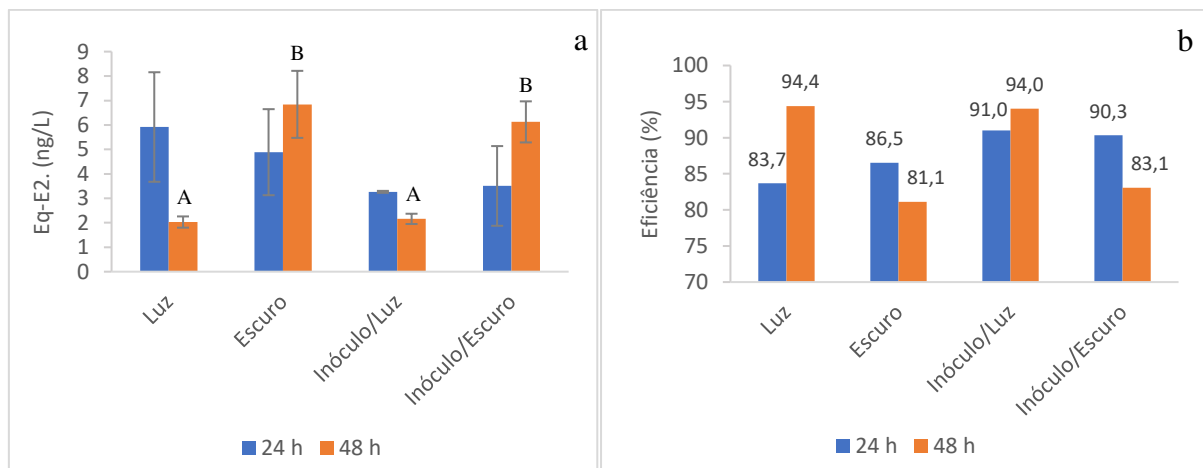
5.3.2 Atividade estrogênica

5.3.2.1 Mecanismos de remoção

Os microrganismos dominantes no inóculo utilizado no experimento para análise dos mecanismos de remoção de atividade estrogênica do efluente do reator UASB foram a bactéria *Aeromonas salmonicida* (54,3% das leituras) e a microalga verde *Acutodesmus obliquus* (97,5% das leituras). Esse experimento foi realizado em regime de batelada durante 2 dias, os dados físicos e químicos estão apresentados na Figura 12. A atividade estrogênica do esgoto (fase solúvel < 0,45 μm) foi de 36,0 ng.L^{-1} Eq-E2, resultado similar ao encontrado em estudo anterior com tratamento em escala de bancada (40,0 ng.L^{-1}) (Silva *et al.*, 2021).

As amostras expostas à luz apresentaram diminuição da atividade estrogênica nos dois dias; já as amostras deixadas no escuro apresentaram redução no primeiro dia e incremento no segundo dia de tratamento (Figura 12). É razoável considerar que possa ocorrer partição de alguns compostos estrogênicos entre a fase dissolvida e a fase sólida, causando aumento da atividade estrogênica na fase dissolvida (Dagnino *et al.*, 2010). Além disso, alguns produtos de degradação podem possuir potência estrogênica maior que a do composto original (Wang, Yuwen *et al.*, 2019a).

Figura 12 - Atividade estrogênica (ng.L^{-1} Eq-E2) (a) e eficiência de remoção (b) de compostos estrogênicos solúveis do esgoto do reator UASB em reatores expostos aos tratamentos com e sem inóculo e com e sem iluminação.



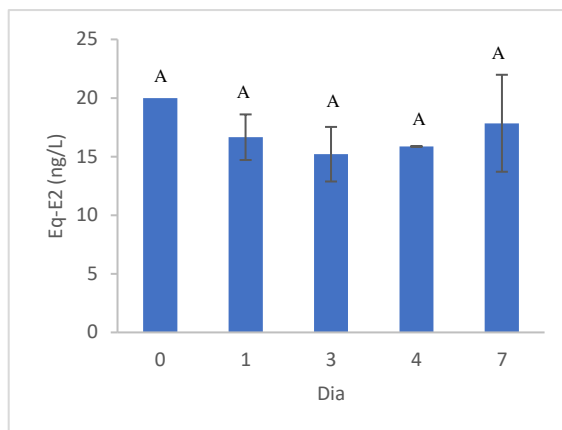
Fonte: elaboração própria

No sistema em que o esgoto foi exposto à luz, sem adição de inóculo, para avaliação da fotodegradação indireta, houve redução de 83,7% da atividade estrogênica após 24 h. No

entanto, no sistema em que o esgoto foi mantido no escuro (sem inóculo), a redução da atividade estrogênica foi ligeiramente maior: 86,5%, sem diferença estatística significativa no nível de 5%. Após 48 h, a redução foi maior no sistema exposto à luz (94,4%) em comparação com o sistema sem iluminação (81,1%) ($\alpha = 0,05$). Não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem os mecanismos de remoção de compostos estrogênicos em efluentes reais para comparação. No entanto, sabe-se que os EEs naturais e E2 podem ser biodegradados por bactérias com eficiências variadas que dependem do processo biológico e das condições operacionais (Pauwels *et al.*, 2008; Yoshimoto *et al.*, 2004). Também foi demonstrado que o uso de um consórcio bacteriano, que está sempre presente no esgoto, pode aumentar a remoção de EEs (AlAhadeb, 2022).

Após 24 horas, os reatores inoculados com o consórcio microalgas-bactérias removeram mais compostos responsáveis pela atividade estrogênica do que os reatores não inoculados, no entanto, os tratamentos não se diferiram estatisticamente ($\alpha = 0,05$). Ao final de 48 h, os reatores expostos à luz, com ou sem inóculo, reduziram a atividade estrogênica para níveis semelhantes, com reduções significativamente maiores do que nos tratamentos escuros. Nos experimentos realizados com E2 (20 ng.L⁻¹ Eq-E2) em meio BG11 para avaliar o papel da luz na remoção do estrógeno, nenhuma mudança significativa na atividade estrogênica ($\alpha = 0,05$) foi encontrada ao longo de sete dias (Figura 13). Portanto, a fotodegradação direta ou induzida pelo meio BG11 não desempenhou um papel na remoção da atividade estrogênica. Wu *et al.*, 2021 demonstraram remoção insignificante de E2 e EE2 por fotodegradação direta e sugeriram que ocorreu degradação fotocatalítica de estrogênios por MOE das algas sob luz visível. De acordo com esses autores, a presença de uma substância semelhante aos ácidos húmicos/fúlvicos produzidos por todas as três espécies de microalgas que eles estudaram pode ter sido responsável por induzir a fotodegradação indireta de estrogênios, uma vez que o ácido húmico e o ácido fúlvico são fotossensibilizadores bem conhecidos em águas superficiais. Esses tipos de substâncias também, provavelmente, estão presentes no esgoto usado no presente estudo.

Figura 13 - Atividade estrogênica (ng.L^{-1} Eq-E2) em reatores contendo meio BG11 autoclavado + E2 para avaliação de fotodegradação direta ou induzida pelo meio.



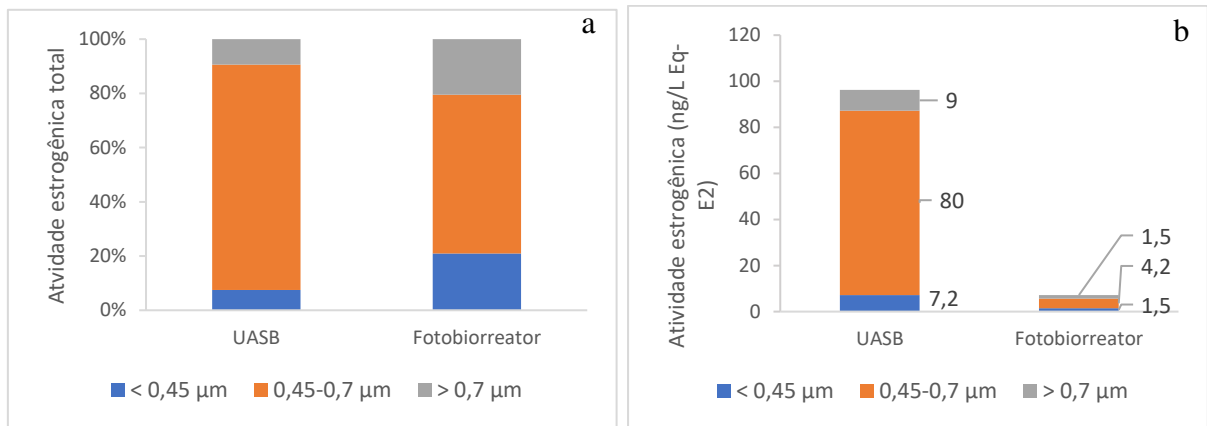
Fonte: elaboração própria

Com base nos resultados destes experimentos, pode-se inferir que a biodegradação aeróbia por microrganismos heterotróficos presentes no efluente secundário e/ou adsorção na fase sólida foram os principais mecanismos de remoção da atividade estrogênica na fase solúvel do esgoto, com a fotodegradação indireta contribuindo em menor grau.

Em seguida, novos experimentos foram realizados para avaliação da adsorção de compostos estrogênicos na biomassa do consórcio. A atividade estrogênica da fração solúvel do esgoto ($7,2 \text{ ng.L}^{-1}$ Eq-E2) foi baixa, enquanto a maior concentração de substâncias estrogênicas no efluente secundário foi encontrada nos sólidos entre $0,45$ e $0,7 \mu\text{m}$ (80 ng.L^{-1} Eq-E2) (Figura 14). A atividade estrogênica na fase sólida de efluentes também foi detectada em outros estudos (Argolo; Gomes; Bila, 2023; Dagnino *et al.*, 2010). Após 6, 24 e 48 h de tratamento no fotobiorreator, a atividade estrogênica nessa fração sólida foi reduzida em 56, 89 e 95%, respectivamente (Figura 15).

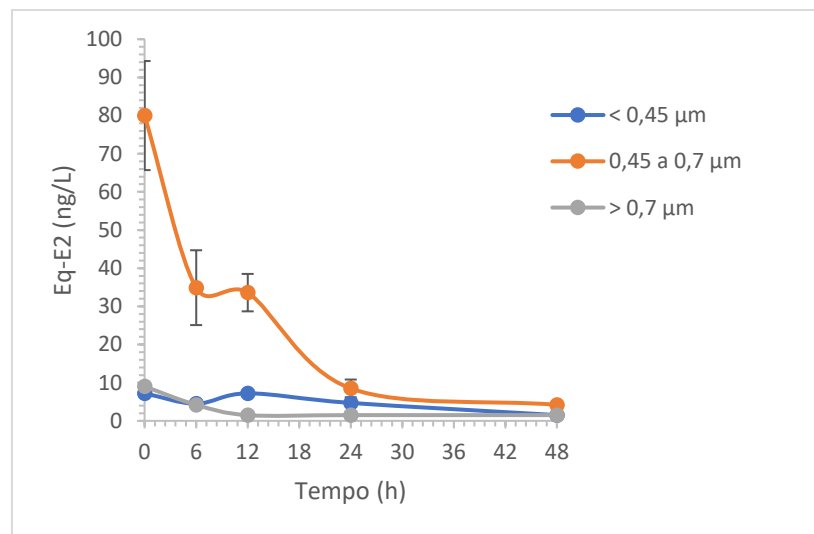
Nos sólidos acima de $0,7 \mu\text{m}$, a atividade estrogênica foi de 9 ng.L^{-1} . Nas primeiras 12 h o valor ficou abaixo do limite de detecção ($1,5 \text{ ng.L}^{-1}$ Eq-E2), com redução de 83%, e se manteve assim até o final do tratamento (Figura 15). Como a adsorção de alguns estrogênios pode ocorrer nos primeiros 30 minutos do tratamento (Ruksrithong; Phattarapattamawong, 2019) e a primeira coleta foi feita após 6 h, não foi possível identificar adsorção na biomassa.

Figura 14 - (a) Contribuição das fases solúvel e suspensa para a atividade estrogênica total dos esgotos em % de Eq-E2 e (b) atividade estrogênica em ng.L^{-1} de Eq-E2 nas frações sólida e dissolvidas do esgoto do reator UASB e no efluente do fotobiorreator após tratamento de 2 dias.



Fonte: elaboração própria

Figura 15 – Atividade estrogênica das frações solúvel e sólida do efluente do fotobiorreator ao longo de 48 h no tratamento do efluente do reator UASB.



Fonte: elaboração própria

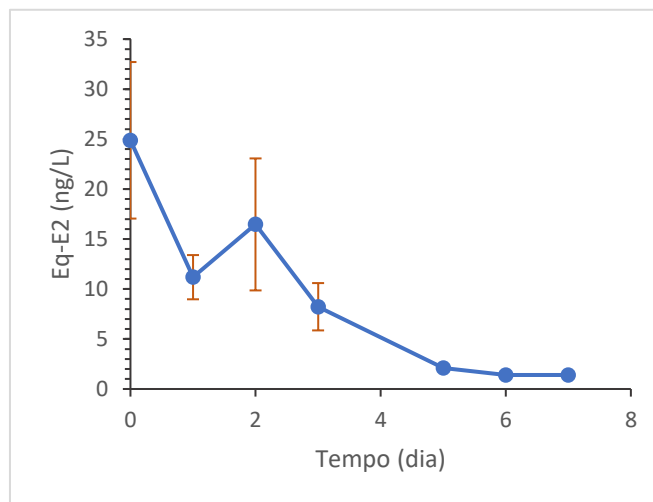
Com esses resultados, é possível constatar que nas condições de temperatura, tempo e iluminância testados, o tratamento em fotobiorreator contendo consórcio microalgas-bactérias reduziu a atividade estrogênica relacionada às partículas sólidas em 48 h, tendo a biodegradação como principal mecanismo de remoção.

Para verificar se a atividade estrogênica não reapareceria ao longo de um tempo de tratamento mais longo (como ocorreu com a toxicidade crônica), ela foi monitorada durante um tratamento de sete dias. A atividade estrogênica inicial da fase solúvel, de 25 ng.L^{-1} Eq-E2 foi

reduzida em 55% após 24 h. Embora após 2 dias tenha sido observada atividade aumentada, no sexto dia ela estava abaixo do limite de detecção de $1,4 \text{ ng.L}^{-1}$ Eq-E2 (Figura 16).

A remoção da atividade estrogênica no reator de 4 L foi mais lenta do que em experimentos usando frascos Erlenmeyer de 250 mL, nos quais foi observada uma redução de mais de 90% na atividade estrogênica da fase solúvel nas primeiras 24 h de tratamento. Isso pode ser devido ao tamanho maior do reator e da menor iluminância (3000 lux x 6000 lux), uma vez que a fotodegradação indireta desempenhou um papel na remoção da atividade estrogênica. Além disso, diferentes microrganismos predominaram nos inóculos usados nos dois experimentos, o que poderia ser esperado ao longo do tempo em um biorreator externo em escala real.

Figura 16 – Atividade estrogênica dos compostos solúveis do efluente secundário durante 7 dias de tratamento com consórcio microalgas-bactérias.



Fonte: elaboração própria

5.4 Conclusão

O tratamento do efluente do reator UASB com consórcio de microalgas-bactérias além de reduzir a concentração de nutrientes como nitrogênio e fósforo, removeu a toxicidade aguda a *C. dubia* em até 48 h de tratamento nas condições avaliadas. A adição de inóculo contendo $2,2 \times 10^9$ cel.L⁻¹ de microalgas removeu a toxicidade em 24 h de tratamento. Também foi observada a redução de 52% da toxicidade aguda apenas pelos microrganismos heterotróficos presentes no próprio esgoto. No entanto, esses microrganismos não foram capazes de eliminar a toxicidade após 48 h, como no tratamento com consórcio e exposição à luz.

A toxicidade crônica à sobrevivência do microcrustáceo também foi eliminada após um tratamento de 7 dias com consórcio, mas a reprodução de *C. dubia* foi mais afetada negativamente no efluente do fotobiorreator em comparação com o efluente secundário, possivelmente pela maior concentração de N-NO₃⁻ presente no efluente deste tratamento.

A biodegradação por microrganismos heterotróficos presentes no próprio efluente foi o principal mecanismo de remoção da atividade estrogênica na fração dissolvida do esgoto, seguido pela fotodegradação indireta induzida pelos compostos presentes no efluente secundário. Os compostos responsáveis pela atividade estrogênica do esgoto foram biodegradados no fotobiorreator nas primeiras horas de tratamento. Em 48 h, esses compostos foram removidos da fração dissolvida e dos sólidos acima de 0,7 µm, até o limite de detecção (1,4 ng.L⁻¹ Eq-E2), e na fração de sólidos entre 0,45 e 0,7 µm, a remoção atingiu 94,7% de eficiência em 48 h.

Este estudo contribui para a compreensão do uso do consórcio microalgas-bactérias na biodegradação de compostos responsáveis pela toxicidade e pela atividade estrogênica em matrizes aquosas complexas, como o esgoto sanitário. A maioria dos estudos disponíveis na literatura avalia espécies isoladas de microalgas em matrizes simples, como meio de cultura ou efluente sintético. Ao considerar a interferência causada pela matriz nos compostos estudados, tem-se resultados mais aproximados ao de um tratamento real em ETEs.

8.2 Referências

ALAHADEB, Jawaher Ibrahim. Effective biodeterioration of a common endocrine disruptor 17 β -estradiol using mixed microbial cultures isolated from wastewater. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 206, 15 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112559>.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Standard Methods*, 541 p., 2017.

ALVES, Daniela Pereira da Silva; TEIXEIRA, Flaviane Borges; TEÓFILO, Monatha Nayara Guimarães; COTRIM, Carlos Filipe Camilo; DE PAULA SILVA, Junilson Augusto; ALMEIDA, Luciane Madureira; BAILÃO, Elisa Flávia Luiz Cardoso. Use of ecotoxicological bioindicators in effluent monitoring — legal implications in Brazil. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, [s. l.], vol. 29, 2024. <https://doi.org/10.1590/S1413-415220230054>.

ARGOLO, Allan dos Santos; GOMES, Giselle; BILA, Daniele Maia. (Anti)estrogenic activity impacted by complex environmental matrices: A DOM and multiphase distribution approach. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 310, 1 Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136917>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustácea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2022.

BAKER, Josh A.; GILRON, Guy; CHALMERS, Ben A.; ELPHICK, James R. Evaluation of the effect of water type on the toxicity of nitrate to aquatic organisms. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 168, p. 435–440, 1 Feb. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.059>.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim. Nova*, [s. l.], vol. 30, no. 3, p. 651–666, 2007.

BRAGA, M. Q.; DE ASSIS, L. R.; FERREIRA, J.; RIBEIRO, V. J.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P. Microalgae cultivation and carotenoid production in paint booth effluent mixed with domestic sewage. *International Journal of Environmental Science and Technology*, [s. l.], 2023. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-05268-y>.

CHO, Hyunki; RYU, Chang Seon; LEE, Sang Ah; ADELI, Zahra; MEUPEA, Brenda Tenou; KIM, Youngsam; KIM, Young Jun. Endocrine-disrupting potential and toxicological effect of para-phenylphenol on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 243, 15 Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113965>.

DAGNINO, Sonia; GOMEZ, Elena; PICOT, Bernadette; CAVAILLÈS, Vincent; CASELLAS, Claude; BALAGUER, Patrick; FENET, Hélène. Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 408, no. 12, p. 2608–2615, May 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.034>.

DE REZENDE, Amanda Teixeira; MOUNTEER, Ann H. Ecological risk assessment of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian surface waters. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 338, 1 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122628>.

DIAS, Amanda Cristina Vieira; GOMES, Frederico Wegenast; BILA, Daniele Maia; SANT'ANNA, Geraldo Lippel; DEZOTTI, Marcia. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 120, p. 41–47, 1 Oct. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>.

DÜPONT, Adriana; LOBO, Eduardo Alcayaga. Evaluation of the efficiency of the sewage treatment plant from the University of Santa Cruz do Sul (UNISC), RS, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, [s. l.], vol. 24, no. 2, p. 119–126, 6 Sep. 2012. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2012005000031>.

DURCIK, Martina; GROBIN, Andrej; ROŠKAR, Robert; TRONTELJ, Jurij; PETERLIN MAŠIČ, Lucija. Estrogenic potency of endocrine disrupting chemicals and their mixtures detected in environmental waters and wastewaters. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 330, 1 Jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138712>.

FANG, Ting Yien; PRAVEENA, Sarva Mangala; DEBURBURE, Claire; ARIS, Ahmad Zaharin; ISMAIL, Sharifah Norkhadijah Syed; RASDI, Irniza. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 165, p. 358–368, 1 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.051>.

GONÇALVES, Ana L.; PIRES, José C.M.; SIMÕES, Manuel. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, [s. l.], vol. 24, p. 403–415, 1 Jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.

KRUSTOK, I.; ODLARE, M.; TRUU, J.; NEHRENHEIM, E. Inhibition of nitrification in municipal wastewater-treating photobioreactors: Effect on algal growth and nutrient uptake. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 202, p. 238–243, 1 Feb. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.020>.

LI, Shengnan; CHU, Yuhao; XIE, Peng; XIE, Youping; CHANG, Haixing; HO, Shih Hsin. Insights into the microalgae-bacteria consortia treating swine wastewater: Symbiotic mechanism and resistance genes analysis. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 349, 1 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126892>.

LIU, Junzhuo; WU, Yonghong; WU, Chenxi; MUYLAERT, Koenraad; VYVERMAN, Wim; YU, Han Qing; MUÑOZ, Raúl; RITTMANN, Bruce. Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 241, p. 1127–1137, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.054>.

LUTTERBECK, Carlos Alexandre; ZERWES, Filipe Vargas; RADTKE, Júlia Fernanda; KÖHLER, Andreas; KIST, Lourdes Teresinha; MACHADO, Ênio Leandro. Integrated system with constructed wetlands for the treatment of domestic wastewaters generated at a rural property – Evaluation of general parameters ecotoxicity and cytogenetics. *Ecological*

Engineering, [s. l.], vol. 115, p. 1–8, 1 May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.01.004>.

MA, Yingxiao; SHEN, Wendi; TANG, Tingting; LI, Zihao; DAI, Ruihua. Environmental estrogens in surface water and their interaction with microalgae: A review. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 807, 10 Feb. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150637>.

MATAMOROS, Víctor; GUTIÉRREZ, Raquel; FERRER, Ivet; GARCÍA, Joan; BAYONA, Josep M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 288, p. 34–42, 5 May 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.002>.

MATAMOROS, Víctor; UGGETTI, Enrica; GARCÍA, Joan; BAYONA, Josep M. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: A laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 301, p. 197–205, 15 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.050>.

NATHANAEL, Rinaldy Jose; ADYANIS, Latonia Nur; OGINAWATI, Katharina. The last decade epidemiologic concern of drinking water contaminants of emerging concern (CECs) in Asian Countries: A scoping review. *Heliyon*, [s. l.], vol. 10, no. 20, 30 Oct. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39236>.

OLIVEIRA, Adriana Paulo de Sousa; ASSEMANY, Paula; COVELL, Lidiane; CALIJURI, Maria Lúcia. Copper multifaceted interferences during swine wastewater treatment in high-rate algal ponds: alterations on nutrient removal, biomass composition and resource recovery. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 324, 1 May 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121364>.

PAUWELS, Bram; WILLE, Klaas; NOPPE, Herlinde; DE BRABANDER, Hubert; VAN DE WIELE, Tom; VERSTRAETE, Willy; BOON, Nico. 17α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17β -estradiol and estriol. *Biodegradation*, [s. l.], vol. 19, no. 5, p. 683–693, 8 Sep. 2008. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9173-z>.

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 and Technology*, [s. l.], vol. 66, no. 12, p. 2562–2569, 2012. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.482>.

RAPTIS, Catherine E.; JURASKE, Ronnie; HELLWEG, Stefanie. Investigating the relationship between toxicity and organic sum-parameters in kraft mill effluents. *Water Research*, [s. l.], vol. 66, p. 180–189, 27 Aug. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.023>.

ROUTLEDGE, Edwin J; SUMPTER, John P. Estrogenic Activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. [*S. l.: s. n.*], 1996.

RUKSRI THONG, Chantima; PHATTARAPATTAMAWONG, Songkeart. Removals of estrone and 17β -estradiol by microalgae cultivation: kinetics and removal mechanisms. *Environmental Technology (United Kingdom)*, [s. l.], vol. 40, no. 2, p. 163–170, 15 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1384068>.

SHASHIREKHA, V.; SIVAKUMAR, M.; SESHADRI, S. Effective C–N–P ratio for growth and nutrient removal efficiency of *Scenedesmus obliquus* in sugar mill effluent. *Energy, Ecology and Environment*, [s. l.], vol. 1, no. 5, p. 283–295, 1 Oct. 2016. <https://doi.org/10.1007/s40974-016-0040-9>.

SILVA, Priscila Romana; MOUNTEER, Ann H; BENJAMIN, Laercio dos Anjos; DE ALMEIDA, Edinael Rodrigues; VITORINO, Flavia Barros; ARCANJO, Gemima Santos; DOS SANTOS PETERSEN, Vinicius Rodrigues. Evaluation of toxicity and estrogenicity in UASB - Treated municipal sewage. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 268, Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128778>.

TIAN, Yajun; ZOU, Jinru; FENG, Li; ZHANG, Liqiu; LIU, Yongze. *Chlorella vulgaris* enhance the photodegradation of chlortetracycline in aqueous solution via extracellular organic matters (EOMs): Role of triplet state EOMs. *Water Research*, [s. l.], vol. 149, p. 35–41, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.076>.

VASSALLE, Lucas; GARCÍA-GALÁN, María Jesús; AQUINO, Sérgio F.; AFONSO, Robson José de Cássia Franco; FERRER, Ivete; PASSOS, Fabiana; R MOTA, Cesar. Can high rate algal ponds be used as post-treatment of UASB reactors to remove micropollutants? *Chemosphere*, [s. l.], vol. 248, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125969>.

VIRUELA, Alexandre; MURGUI, Mónica; GÓMEZ-GIL, Tao; DURÁN, Freddy; ROBLES, Ángel; RUANO, María Victoria; FERRER, José; SECO, Aurora. Water resource recovery by means of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors using the effluent from an anaerobic membrane bioreactor fed with pre-treated sewage. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 218, p. 447–454, 1 Oct. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.116>.

WANG, Yuwen; SUN, Qian; LI, Yan; WANG, Hongjie; WU, Kun; YU, Chang Ping. Biotransformation of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by four species of microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 180, p. 723–732, 30 Sep. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.061>.

WU, Lingling; SHAO, Ying; HU, Zhangjun; GAO, Hongwen. Effects of soluble sulfide on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, [s. l.], vol. 42, p. 183–189, 1 Mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.019>.

WU, Pei Hsun; YEH, Hsin Yi; CHOU, Pei Hsin; HSIAO, Wen Wei; YU, Chang Ping. Algal extracellular organic matter mediated photocatalytic degradation of estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 209, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111818>.

YOSHIMOTO, Takeshi; NAGAI, Fumiko; FUJIMOTO, Junji; WATANABE, Koichi; MIZUKOSHI, Harumi; MAKINO, Takashi; KIMURA, Kazumasa; SAINO, Hideyuki; SAWADA, Haruji; OMURA, Hiroshi. Degradation of Estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* Isolates from Activated Sludge in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], vol. 70, no. 9, p. 5283–5289, Sep. 2004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5283-5289.2004>.

YOUNG, P.; TAYLOR, M.; FALLOWFIELD, H. J. Mini-review: high rate algal ponds, flexible systems for sustainable wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], vol. 33, no. 6, 1 Jun. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2282-x>.

ZAGATTO, Pedro; Bertoletti, Eduardo. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 1st ed. [S. l.: s. n.], 2006.

6 PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL EM LAGOAS DE ALTA TAXA E SÍNTESE DE BIOPLÁSTICO

Resumo

O crescente interesse em sustentabilidade impulsiona a busca por alternativas aos plásticos convencionais e por soluções para o tratamento de efluentes. Este estudo investigou a produção de bioplásticos a partir da biomassa de um consórcio de microalgas cultivado em efluente sanitário secundário. A biomassa microalgal, rica em proteínas, foi produzida em lagoas de alta taxa e demonstrou eficiência na biorremediação do efluente. A extração de proteínas da biomassa foi otimizada por meio da metodologia de superfície de resposta, com a identificação de condições ideais de pH (12), tempo (47 min) e temperatura (93 °C). Sob essas condições, o modelo previu um rendimento de 11,3% de proteína extraída a partir de uma concentração inicial de 4 g.L⁻¹ de biomassa. Bioplásticos foram sintetizados com a utilização tanto da biomassa total quanto da solução contendo as proteínas extraídas, com a adição de gelatina e glicerol. Avaliou-se a influência das proporções dos componentes e das condições de processamento nas propriedades dos bioplásticos, incluindo o intumescimento em água. Adicionalmente, investigou-se o efeito da incorporação de óxido de magnésio e amido de milho. Os bioplásticos produzidos com a biomassa total e com a solução proteica se mostraram viáveis, com superfícies homogêneas (analisadas por microscopia eletrônica de varredura contendo), inibiram o crescimento relativo das radículas em ensaios de germinação com sementes de *Eruca sativa*, sendo classificados como moderadamente fitotóxicos. Por outro lado, a adição conjunta de óxido de magnésio e amido de milho aos bioplásticos à base de proteínas extraídas potencializou a germinação. Este trabalho demonstra o potencial da biomassa microalgal cultivada em águas residuárias como matéria-prima para a produção de bioplásticos, o que contribui para uma bioeconomia circular.

Palavras-chave: Biorremediação; Fitotoxicidade; Microalgas; Proteínas; Sustentabilidade

6.1 Introdução

Com a crescente demanda por soluções sustentáveis para mitigar a degradação ambiental e reduzir a dependência de recursos fósseis, o uso de microalgas surgiu como um caminho promissor na busca por uma bioeconomia circular. As microalgas, eficientes na

fotossíntese e adaptáveis a diversos ambientes, oferecem um benefício triplo: atuam como sumidouros de carbono (reduzindo os níveis atmosféricos de CO₂), tratam efluentes e servem como fonte de matérias-primas para a obtenção de produtos de interesse comercial (Calijuri *et al.*, 2022; Rawat *et al.*, 2011).

Uma aplicação relevante da biomassa de microalgas é a produção de bioplásticos. Diferentemente dos bioplásticos derivados de plantas cultivadas em terras agrícolas (que competem com a cadeia de alimentos e demandam fertilizantes e pesticidas), as microalgas não exigem terras férteis e podem ser cultivadas em efluentes ou ambientes marinhos. Além disso, apresentam rápido crescimento e diversidade metabólica, o que permite sua utilização em diferentes estratégias de produção de bioplásticos. Essa produção pode ocorrer de forma direta, utilizando-se a biomassa microalgal (células inteiras), ou de maneira indireta, por meio da extração de biopolímeros produzidos pelas células, como os poli-hidroxicanoatos (PHA), o amido e as proteínas (Lutzu *et al.*, 2021; Rajpoot *et al.*, 2022; Tennakoon *et al.*, 2023).

Apesar do promissor potencial, ainda existem desafios relacionados à otimização das propriedades mecânicas e à viabilidade econômica da produção de bioplásticos de microalgas em larga escala (Iyer *et al.*, 2023; Roy Chong *et al.*, 2022). A produção de bioplásticos com células inteiras de microalgas apresenta vantagens potenciais em termos de simplificação do processo produtivo e redução de custos, uma vez que etapas de extração intensivas em energia são minimizadas ou eliminadas. (López Rocha *et al.*, 2020; Roy Chong *et al.*, 2022).

Diversos métodos de processamento podem ser empregados para produzir bioplásticos a partir de biomassa de microalgas, como exemplo, moldagem por compressão a quente, mistura por fusão (*casting*) moldagem por injeção e extrusão (Rajpoot *et al.*, 2022). A escolha do método pode influenciar as propriedades finais do bioplástico (Adamu Ugya *et al.*, 2023). Por exemplo, estudos já demonstraram a produção de bioplásticos resistentes a partir de *Spirulina* por prensagem a quente, sem aditivos, com propriedades mecânicas comparáveis ao poliestireno e biodegradáveis no solo (Iyer *et al.* 2023).

A composição bioquímica da biomassa de microalgas, o que inclui o teor de proteínas, carboidratos e lipídios, desempenha um papel crucial nas propriedades do bioplástico produzido (López Rocha *et al.*, 2020; Roy Chong *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). Microalgas com alto teor de proteína, como *Chlorella* (51–58%) e *Spirulina* (46–63%), são consideradas adequadas para a produção de bioplásticos devido à sua semelhança com plásticos petroquímicos (González-Balderas *et al.*, 2020; López Rocha *et al.*, 2020; Roy Chong *et al.*, 2022). As proteínas são polímeros naturais com características adequadas para formação de filmes

plásticos, suas estruturas permitem a formação de redes tridimensionais por meio de interações moleculares fortes, o que lhes confere melhor resistência mecânica comparado a bioplásticos baseados em polissacarídeos e lipídios (Mubarak Aldawsari *et al.*, 2023). A adição de glicerol é fundamental na formação de filmes plásticos proteicos, pois atua como um plastificante. Ele se insere na rede proteica tridimensional, reduz as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, aumenta a mobilidade das cadeias e a flexibilidade do filme. Filmes proteicos puros tendem a ser quebradiços, e a introdução de glicerol confere maior elasticidade ao sistema (Ben; Samsudin; Yhaya, 2022; Leite; Pinto Jr; Silva, 2020).

Apesar do alto teor de proteínas em microalgas, um grande desafio é a sua acessibilidade, uma vez que estão contidas dentro de paredes celulares (Ng, Jun Wei *et al.*, 2024). Métodos de ruptura celular, mecânicos (como homogeneização de alta pressão e moagem de esferas) ou não mecânicos (químicos ou enzimáticos), foram desenvolvidos para a liberação de conteúdos intracelulares. A extração de proteínas de consórcios de microalgas, em particular, é complexa devido à diversidade de linhagens e variações na estrutura da parede celular e solubilidade das proteínas (Ng, Jun Wei *et al.*, 2024; Safi *et al.*, 2015; Wang, Zijing *et al.*, 2024).

Embora diversos estudos tenham explorado o potencial das microalgas na produção de bioplásticos, a maior parte das pesquisas existentes concentra-se no uso de culturas puras, cultivadas em meios sintéticos controlados (Ciapponi; Turri; Levi, 2019; Iyer *et al.*, 2023; Moreira *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2022). Pouco se tem investigado, no entanto, o uso de consórcios de microalgas cultivados em águas residuárias reais, o que representa uma abordagem mais alinhada aos princípios da sustentabilidade e da bioeconomia circular (López Rocha *et al.*, 2020).

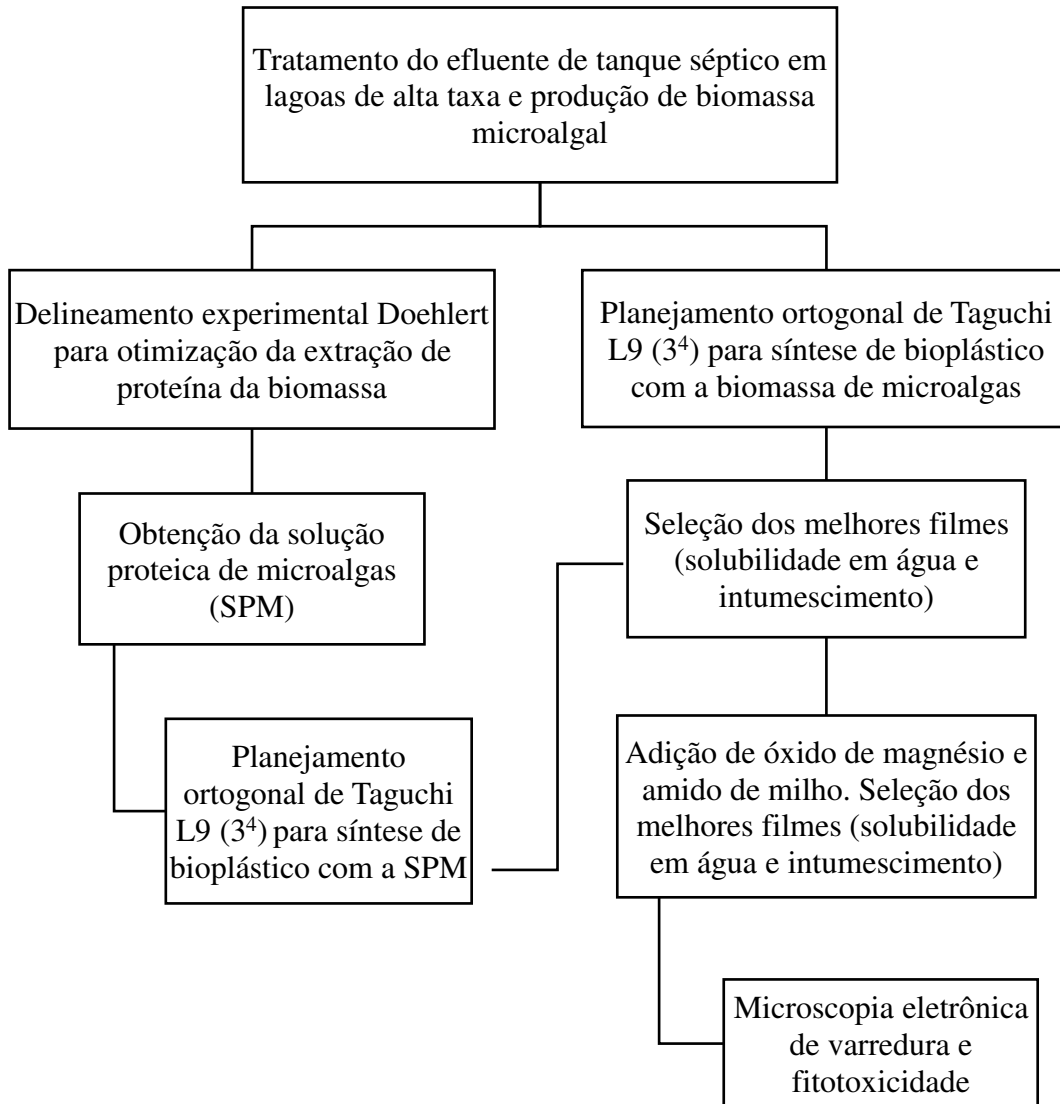
Neste contexto, os objetivos deste estudo foram: 1) produzir biomassa de microalgas em águas residuárias; 2) otimizar a extração de proteínas do consórcio identificando o pH, a temperatura e o tempo de extração ideais para o rendimento máximo de proteínas; 3) produzir bioplásticos com a biomassa de microalgas e com a solução proteica obtida após extração.

Ao integrar essas etapas em um modelo de bioeconomia circular, este estudo visa demonstrar como as microalgas podem contribuir tanto para a redução de resíduos quanto para a produção de bioprodutos valiosos, o que promove práticas sustentáveis nas indústrias de biotecnologia e materiais.

6.2 Material e Métodos

A Figura 1 apresenta um resumo das etapas do desenvolvimento do estudo.

Figura 1 – Fluxograma detalhado das etapas experimentais para produção dos bioplásticos.



Fonte: elaboração própria

6.2.1 Tratamento do efluente e produção de biomassa

O esgoto sanitário foi coletado após tratamento em tanque séptico da estação de tratamento de esgoto (ETE) localizada no bairro Romão dos Reis, na cidade de Viçosa-MG. O

efluente foi transportado até o Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e armazenado em caixas de cinco mil litros até o momento de abastecimento das LATs.

O tratamento do efluente foi realizado em regime de batelada, durante nove dias dos meses de maio e junho de 2024 na área experimental do LESA. As temperaturas mínima e máxima durante o período de cultivo foram de 10,4 °C e 27,7 °C, respectivamente, a umidade relativa média foi de 83% e a radiação global de 1.148 KJ/m², não houve precipitação pluviométrica durante os dias experimentais. Foram utilizadas três LATs com estrutura de fibra de vidro e pás com seis lâminas em aço inox, movimentadas em velocidade de aproximadamente 0,13 m s⁻¹. As LATs, com 1,28 m de largura e 2,86 m de comprimento, foram operadas com profundidade útil de 0,26 m e volume útil, de 860 litros.

Cada LAT foi inoculada com 10⁶ cel.L⁻¹ de microalgas, o que correspondeu a 20% v/v de inóculo. Ao final do tratamento as pás foram desligadas para sedimentação da biomassa produzida. O sobrenadante foi descartado e a biomassa coletada foi centrifugada (Hitachi CR 21GIII) a 2.683 g por 15 minutos, congelada e liofilizada (Solab, SL-404) a -40 °C e -700 mmHg por seis dias. A biomassa liofilizada foi macerada com almofariz e pistilo e passada em peneira com abertura de 0,3 mm (48 mesh).

6.2.2 Caracterização do efluente

A eficiência do tratamento quanto à remoção de carbono total dissolvido (CTD), nitrogênio amoniacal (N-NH₄), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio na forma de nitrato (N-NO₃⁻), fósforo solúvel (P_{sol}) e atividade estrogênica foi avaliada conforme itens 5.2.8 e 5.2.11. O crescimento microalgal foi acompanhado ao longo do tratamento pela análise de clorofila-a, e o desenvolvimento do consórcio microalgas-bactérias, por sólidos suspensos voláteis (SSV). A variação de oxigênio dissolvido (OD) e pH também foi monitorada durante o processo.

6.2.3 Caracterização da biomassa

O teor de carboidratos da biomassa foi determinado por hidrólise ácida quantitativa (Hoebler *et al.*, 1989), seguido pelo método fenol-ácido sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956) e espectrofotometria (490 nm) com curva padrão de glicose. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método 4500-N_{org}C do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) (APHA, 2017) com fator de conversão de nitrogênio em proteína de

6,25 (Zhong *et al.*, 2012). Carbono orgânico total (COT) foi determinado no analisador SSM-5000A acoplado ao TOC-V_{CSH} (Shimadzu).

Umidade, cinzas, matéria volátil e teor de carbono fixo foram determinados de acordo com *American Society for Testing and Materials* (ASTM E872, 2012). Inicialmente, 1 g de biomassa foi seco a 105 ± 2 °C por 1 h. O teor de umidade foi determinado pela diferença de massa antes e depois da secagem. Em seguida, a amostra foi aquecida a 900 ± 5 °C por 7 min para determinar a matéria volátil. O teor de cinzas foi determinado a 700 ± 5 °C por 4 h. Finalmente, o teor de carbono fixo foi determinado por diferença.

A identificação dos principais microrganismos presentes na biomassa foi realizada na Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil), por meio do sequenciamento do amplicon 16S rRNA para bactérias e 18S rRNA para microalgas, conforme descrito no item 5.2.2.

6.2.4 Extração de proteína

Para otimizar a extração de proteína do consórcio de microalgas, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta com um delineamento experimental Doehlert.

A biomassa de microalgas, previamente peneirada, foi dissolvida em água purificada na proporção de 1:250 m/v (4 g.L^{-1}) e homogeneizada por 30 minutos em agitador magnético. Após o ajuste do pH, a mistura foi mantida em banho-maria sob condições predefinidas pelo delineamento experimental. No final do tempo de reação, as amostras foram centrifugadas a 2.500 g por 3 minutos para remover as células de microalgas. A variável de resposta foi a concentração de proteína solubilizada no sobrenadante (denominado solução proteica de microalgas - SPM), que foi então quantificada.

Três variáveis independentes (fatores operacionais) foram avaliadas: pH, tempo (min) e temperatura (°C). Os níveis para cada fator — pH (2–12, sete níveis), tempo (10–50 min, cinco níveis) e temperatura (35–95 °C, três níveis) — foram predefinidos com base em experimentos preliminares. O delineamento compreendeu 19 execuções experimentais, incluindo as condições do ponto central (pH 7, 65 °C, 30 min), que foram realizadas em septuplicata para análise da matriz de Doehlert. Todos os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória. Os fatores significativos identificados foram então utilizados para a otimização através da metodologia de superfície de resposta. O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o software Minitab Statistical Software 22.

6.2.5 Síntese de bioplástico

Os bioplásticos foram sintetizados pelo método *casting*. Na preparação dos filmes de bioplástico, foram utilizados os seguintes componentes: biomassa de microalgas, SPM, gelatina comercial (Dr. Oetker, Brasil), amido de milho (Maizena, Brasil), glicerol (Êxodo Científica, Brasil) e óxido de magnésio (Vetec Química, Brasil). A gelatina foi incorporada em todas as formulações para promover a formação dos filmes plásticos. O glicerol foi utilizado como plastificante. Os demais aditivos (amido de milho e óxido de magnésio) foram adicionados para avaliar a influência na resistência à água dos filmes.

Um planejamento ortogonal de Taguchi L9 (3^4) foi empregado para investigar a influência das seguintes variáveis na formação dos filmes: relação biomassa/gelatina (25, 50 e 75%), concentração de glicerol (0,4, 0,6 e 0,8 g), temperatura (60, 70 e 80 °C) e tempo de reação (10, 20 e 30 min). Este planejamento foi executado tanto com a biomassa quanto com a SPM, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento experimental para seleção do tempo, temperatura, proporções de biomassa, gelatina e glicerol na produção de bioplástico a partir de biomassa de microalgas.

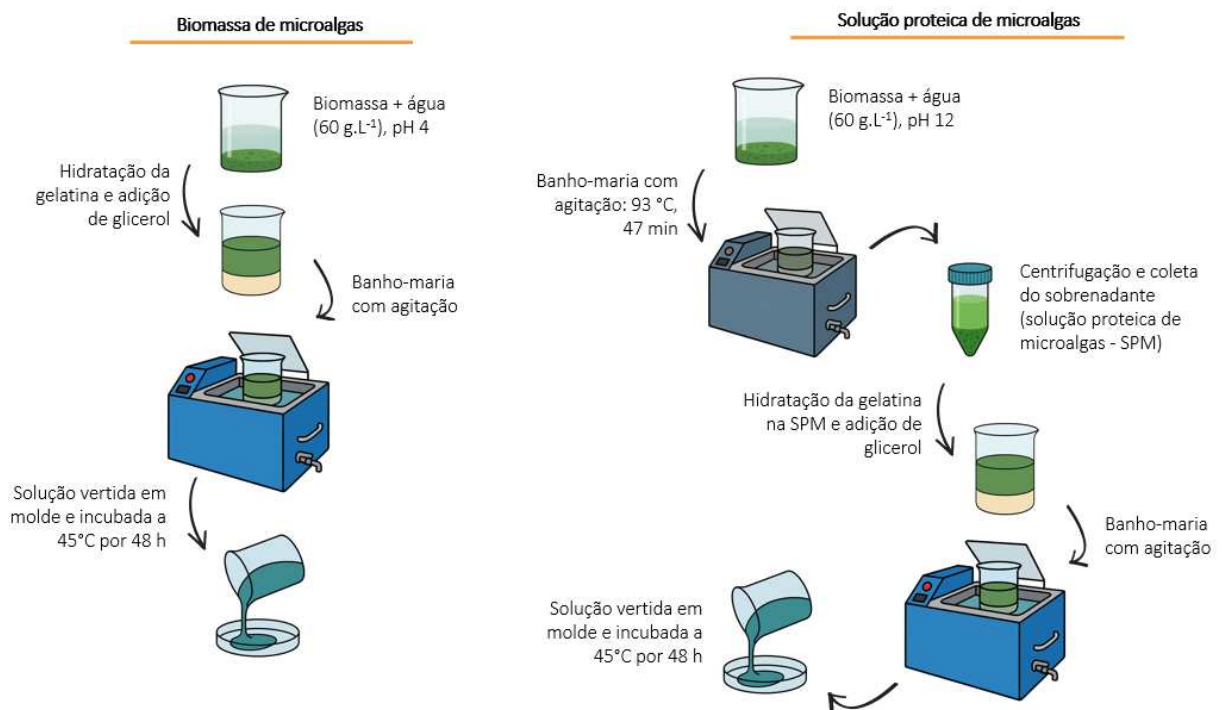
ID	Biomassa/ gelatina	Glicerol (g)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	25% biomassa/75% gelatina	0,4	60	10
2	25% biomassa/75% gelatina	0,6	70	20
3	25% biomassa/75% gelatina	0,8	80	30
4	50% biomassa/50% gelatina	0,4	70	30
5	50% biomassa/50% gelatina	0,6	80	10
6	50% biomassa/50% gelatina	0,8	60	20
7	75% biomassa/25% gelatina	0,4	80	20
8	75% biomassa/25% gelatina	0,6	60	30
9	75% biomassa/25% gelatina	0,8	70	10

Inicialmente, para a síntese dos filmes, a biomassa foi dissolvida em água purificada e a solução ajustada para pH 4. Este pH foi selecionado com base em testes preliminares que avaliaram a formação de plásticos em diversos valores de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12). Em um segundo conjunto de experimentos, a SPM (obtida após a extração sob condições ótimas de 93 °C, 47 min e pH 12) foi empregada para a síntese de bioplásticos.

A proporção total de sólidos (biomassa + gelatina) para o volume de água foi padronizada em 1:17 m/v (60 g.L⁻¹) para todos os filmes, tanto aqueles preparados com a biomassa quanto com a SPM. A preparação envolveu a hidratação da gelatina na respectiva solução de biomassa ou extrato proteico. Após a adição do glicerol, a mistura foi mantida em

banho-maria sob agitação mecânica, seguindo os tempos e temperaturas definidos na Tabela 2. Ao final do processo, o líquido foi vertido em moldes plásticos (8,5 cm de diâmetro) e seco em incubadoras a 45 ± 1 °C por 48 h. Após a secagem, os filmes foram desmoldados, e o índice de intumescimento de cada tratamento foi avaliado. As formulações que resultaram em menor intumescimento foram selecionadas para a etapa subsequente. A Figura 2 ilustra as etapas de preparo dos bioplásticos.

Figura 2 - Representação gráfica dos processos de produção dos bioplásticos com a biomassa e com a solução proteica de microalgas.



Fonte: Elaboração própria

Em uma terceira etapa, a influência dos aditivos óxido de magnésio e amido de milho foi investigada nas formulações selecionadas anteriormente, conforme detalhado na Tabela 2. Por fim, os bioplásticos com o melhor desempenho foram submetidos à caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a ensaios de germinação.

Tabela 2. Planejamento experimental para verificação da influência dos aditivos óxido de magnésio e amido de milho nos bioplásticos com menor índice de intumescimento.

ID	Tratamento	MgO (% m/m)	Amido de milho (% m/m)
C	Controle	0	0
Mg	MgO	1	0
Am	Amido de milho	0	5
MA	MgO + amido de milho	1	5

6.2.6 Intumescimento

O intumescimento foi determinado com base em Jiménez-Rosado et al. (2020), com modificações. Plásticos com dimensões de 2,5 x 2,5 cm foram mantidos em um dessecador contendo sílica gel e submetidos a repetidas imersões em água por períodos de 2, 15 e 45 min. Ao final dos tempos determinados, o excesso de água dos plásticos foi removido usando filtros de papel. O intumescimento foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{w_2 - w_1}{w_1} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

em que w_1 é o peso do plástico seco antes da imersão em água e w_2 é o peso do plástico após a imersão.

6.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

A obtenção das imagens da superfície dos filmes produzidos foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, do Departamento de Física da UFV com uso do microscópio eletrônico de varredura JSM-6010LA, marca JEOL. As imagens foram obtidas com voltagem de aceleração de 10 kV. As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio cobertos com fita de carbono e revestidas por pulverização com uma fina camada de ouro por meio do metalizador Quorum Q150R S do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

6.2.8 Ensaio de germinação

Os bioensaios consistiram em incubar sementes de rúcula (*Eruca sativa*) (Isla, Brasil) a 25 °C por 4 dias em contato com uma solução de bioplástico. Os procedimentos foram realizados de acordo com Young *et al.* (2012), com modificações. Para o preparo da solução, 20 mg do bioplástico foi adicionado em 30 mL de água purificada e mantido por 60 min em agitador magnético. Em seguida, a solução foi deixada em repouso por 15 min e 4 mL do

sobrenadante foi adicionado nas placas de Petri contendo, cada uma, 10 sementes de *E. sativa*. Foram preparadas três réplicas para cada solução, água purificada foi utilizada como controle neutro. Os ensaios foram conduzidos no LESA.

Após o período de incubação, as sementes foram analisadas pela quantidade de sementes germinadas e pelo comprimento da raiz. A medição foi feita com um paquímetro digital de 150 mm e precisão de 0,001 cm (MTK-5100). A porcentagem de germinação absoluta (% GA), foi calculada de acordo com a Equação 2 e o índice de germinação (IG) foi obtido por meio da Equação 3. Para a classificação de Lumbaque *et al.* (2016), foi utilizada a Equação 4, que expressa o crescimento relativo da radícula (CRR).

$$\% GA = \frac{\text{média aritmética das sementes germinadas no tratamento}}{\text{média aritmética das sementes germinadas no controle neutro}} \quad \text{Equação 2}$$

$$IG = \frac{(\%GA) \times (\%CRR)}{100} \quad \text{Equação 3}$$

$$CRR = \frac{\text{média aritmética do comprimento das radículas no tratamento}}{\text{média aritmética do comprimento das radículas no controle neutro}} \quad \text{Equação 4}$$

O grau de toxicidade presente na amostra foi avaliado pelo CRR e pelo IG (Peduto; Jesus; Kohatsu, 2019; Young, Brian Jonathan *et al.*, 2012). As classificações são apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Classificação do efeito do tratamento a partir do crescimento relativo da radícula (CRR).

Faixa	Efeito
$0 < CRR < 0,8$	Inibição no crescimento da raiz
$0,8 \leq CRR \leq 1,2$	Nenhum efeito significativo
$CRR > 1,2$	Estímulo do crescimento da raiz

Tabela 4 – Classificação do efeito do tratamento a partir do índice de germinação (IG).

Índice de germinação (IG)	Classificação
< 30	Muito fitotóxico
$30 - 60$	Fitotóxico
$60 - 80$	Moderadamente fitotóxico
$80 - 100$	Não fitotóxico
> 100	Potencializa a germinação

6.2.9 Análises estatísticas

Para verificar diferenças estatísticas significativas entre os resultados de fitotoxicidade, utilizou-se o software Jamovi Project (versão 2.5). Primeiramente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição normal das medidas. Em seguida, o teste de Levine foi utilizado para testar a homogeneidade de variância. Após a verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelos testes *post hoc* de Tukey, com confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Tratamento do efluente em LATs

Os microrganismos dominantes na biomassa produzida nas LATs foram as bactérias *Romboutsia timonensis* (12,1% das leituras), *Xanthomonadaceae bacterium* (10,54% das leituras) e *Rhodanobacteraceae bacterium* (9,76% das leituras). As microalgas dominantes foram *Scenedesmus abundas*, (54,4% das leituras) e *Acutodesmus obliquus* (31,4% das leituras).

A concentração de N-NH₄⁺ no efluente de fossa séptica foi de 62 mg.L⁻¹. Ao final do tratamento em LATs o nitrogênio amoniacal não foi mais detectado. Houve redução de 84% de nitrogênio orgânico e formação de nitrato, 625% maior do que o inicial. A concentração inicial de P_{sol} foi de 8,0 mg.L⁻¹, e a eficiência média de remoção nas três LATs foi de 50% (Tabela 5).

Tabela 5 – Níveis de nutrientes no efluentes de tanque séptico e das LATs após tratamento de 9 dias em regime de batelada.

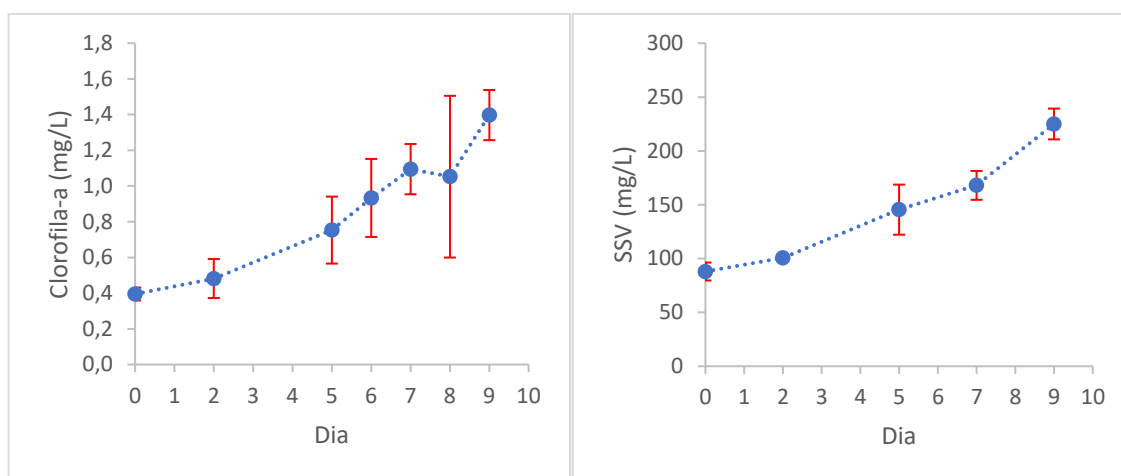
Parâmetros	Tanque séptico (mg.L ⁻¹)	LATs (mg.L ⁻¹)
N _{org}	83 ± 0,11	13,5 ± 0,17
N-NH ₄ ⁺	62 ± 3,4	< LD
N-NO ₃ ⁻	20 ± 1,5	145 ± 11
P _{sol}	8,0 ± 0,3	4,0 ± 1,2

LD: limite de detecção

Houve aumento da clorofila-a produzida pelas microalgas durante os sete primeiros dias, uma queda no oitavo dia e um pequeno aumento ao final do tratamento. Comportamento similar foi observado para a biomassa, representada como SSV (Figura 3). A produção média final de clorofila-a foi de 1,4 mg.L⁻¹. Produção similar (1,1 mg.L⁻¹), foi obtida em LATs com TDH de 8 dias com efluente de reator UASB (Couto *et al.*, 2021). A concentração média final

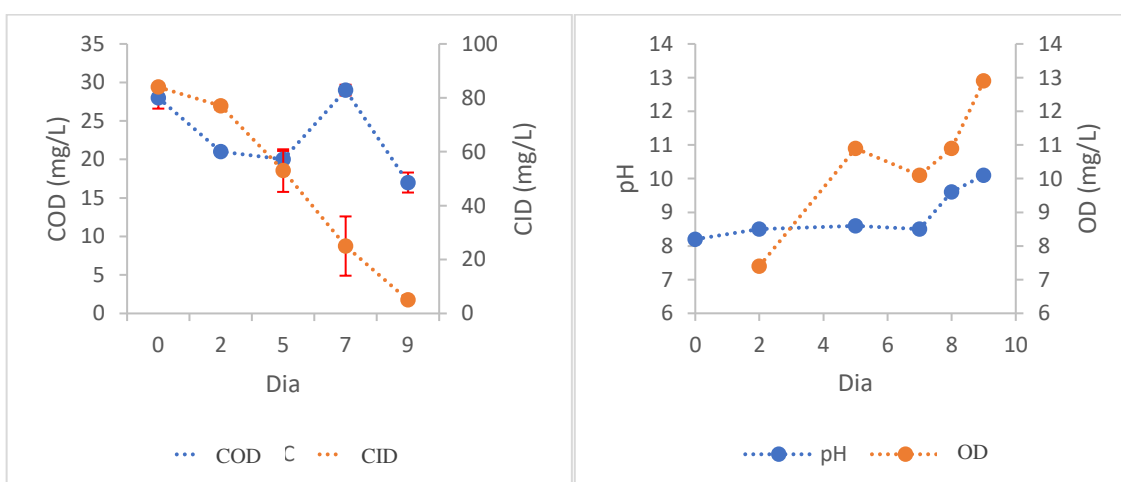
de SSV foi de 225 mg.L^{-1} , valores ligeiramente superiores ao encontrado em sistemas UASB-LATs em outros estudos (Santiago *et al.*, 2013; Vassalle *et al.*, 2020). As reações fotossintéticas reduziram o carbono inorgânico inicial de 84 mg.L^{-1} para 5 mg.L^{-1} , além de aumentar a concentração de O_2 dissolvido no meio (Figura 4).

Figura 3 – Crescimento microalgal (clorofila-a) e crescimento da biomassa (SSV) ao longo de 9 dias de tratamento em regime de batelada do efluente secundário em LATs (média e desvio padrão de três LATs).



Fonte: elaboração própria

Figura 4 – Concentrações de carbono dissolvido, oxigênio dissolvido e valores de pH ao longo de 9 dias de tratamento em regime de batelada do efluente secundário em LATs (média e desvio padrão de três LATs).



Fonte: elaboração própria.

Os resultados apresentados nas Figuras 3 e 4, em conjunto com a identificação dos microrganismos dominantes na biomassa, permitem uma análise dos processos de remoção de

nitrogênio no sistema. A redução do nitrogênio orgânico (84%) observada após nove dias de tratamento em LATs, juntamente com a completa remoção do N-NH₄⁺ e o aumento de 625% de N-NO₃⁻, evidencia a atuação sinérgica de múltiplos processos biológicos e da comunidade microbiana identificada no sistema. Estes processos incluem a mineralização do N_{org}, nitrificação, assimilação por microalgas e, possivelmente, volatilização de NH₃.

A mineralização do nitrogênio orgânico, ou amonificação, representa a etapa inicial para sua conversão em formas assimiláveis por microalgas. A bactéria heterotrófica *Romboutsia timonensis*, dominante na biomassa, é reconhecida pela capacidade de degradar compostos nitrogenados complexos, como aminoácidos e peptídeos, o que pode causar a liberação de N-NH₄⁺ (Gerritsen *et al.*, 2019). Essa conversão torna o nitrogênio disponível para as etapas subsequentes do ciclo.

Em seguida, a nitrificação emerge como um processo central. A total ausência de N-NH₄⁺ no efluente tratado, inicialmente presente em 62 mg.L⁻¹, associada ao aumento do N-NO₃⁻ de 20 para 145 mg.L⁻¹, indica atividade nitrificante. A presença de *Xanthomonadaceae bacterium*, que tem o potencial de participar da oxidação de amônia e de nitrito, por vias ainda não caracterizadas, reforça essa hipótese (Baskaran *et al.*, 2020). A nitrificação foi favorecida pelas condições do sistema, incluindo a mineralização de N_{org}, a elevada concentração de oxigênio dissolvido e o pH alto, ambos resultantes da intensa atividade fotossintética.

Simultaneamente, a assimilação de nitrogênio pelas microalgas foi um componente importante da remoção de N-NH₄⁺. As espécies dominantes, *Scenedesmus abundans* e *Acutodesmus obliquus*, são amplamente reconhecidas por sua eficiência na absorção de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ de efluentes (González-Garcinuño *et al.*, 2014; Liu, X. *et al.*, 2019). O crescimento microalgal foi evidenciado pelo aumento da clorofila-a e dos SSV. A absorção ativa de nitrogênio pelas microalgas foi impulsionada pela elevada demanda metabólica por nutrientes para síntese de proteínas e ácidos nucleicos.

Além disso, o pH final elevado (10,9) reflete o consumo de CO₂ nas reações fotossintéticas, que também resultaram na redução da concentração de carbono inorgânico de 84 mg.L⁻¹ para 5 mg.L⁻¹. Esse ambiente alcalino pode ter promovido a volatilização de amônia (NH₃), especialmente durante o pico da atividade fotossintética, contribuindo ainda mais para a remoção de N-NH₄⁺.

Portanto, a redução de N_{org} pode ser devido à sua transformação biológica e remobilização no ecossistema reativo das LATs. O consórcio demonstrou elevada capacidade

de biorremediação ao converter nitrogênio orgânico complexo em formas inorgânicas assimiláveis e, finalmente, fixá-lo na biomassa microbiana.

Por fim, foi avaliada a remoção da atividade estrogênica pelo tratamento nas LATs. No início do tratamento, não foi detectada estrogenicidade na fração dissolvida ($< 0,45 \mu\text{m}$) e na fração de sólidos com dimensões superiores a $0,7 \mu\text{m}$. Já nos sólidos entre $0,45$ e $0,7 \mu\text{m}$, a atividade estrogênica média foi de $19,1 \text{ ng.L}^{-1} \text{ Eq-E2}$. Após o período de tratamento, não foi detectada a atividade estrogênica no efluente final e na fração sólida (biomassa) em nenhuma das LATs (Tabela 6). Vassalle *et al.* (2020) avaliaram a capacidade de remoção de micropoluentes (incluindo estrógenos) por um sistema UASB seguido por LATs. Os autores observaram alta eficiência na remoção da maioria dos compostos, concluindo que a combinação de tratamento anaeróbio seguido por tratamento aeróbio com consórcio microalgas-bactérias, mostrou-se eficaz na remoção de diversos poluentes, corroborando o presente estudo, que concluiu que o consórcio também foi eficaz na biodegradação de compostos que conferem atividade estrogênica ao efluente, bem como de possíveis subprodutos estrogênicos formados.

Tabela 6 – Atividade estrogênica nas frações solúveis e sólidas após tratamento do efluente de tanque séptico em LATs.

Frações	Eq-E2 (ng.L ⁻¹)	
	Inicial	Final
< 0,45 μm	< 1,4	< 1,4
0,45 – 0,7 μm	$19,1 \pm 5,9$	< 1,4
> 0,7 μm	< 1,4	< 1,4

6.3.2 Biomassa de microalgas

Ao final do tratamento, a biomassa produzida nas três LATs, com base no SST, foi de 657 g. Carboidratos e proteínas corresponderam a $17,2 \pm 0,9\%$ e $43,3 \pm 0,18\%$ do peso úmido da biomassa (liofilizada e peneirada), respectivamente. As demais características da biomassa são apresentadas na Tabela 7. O conteúdo elevado de proteínas reforça a eficiência do consórcio na assimilação do nitrogênio do efluente, previamente observado pela redução de N-NH_4^+ e N_{org} e aumento de clorofila-a. A biomassa apresentou baixo teor de umidade ($7,5 \pm 0,5\%$) e alto teor de matéria volátil ($76,7 \pm 1,2\%$). O teor de cinzas ($14,6 \pm 1,4\%$) está dentro da faixa esperada para biomassa cultivada em efluente, podendo ser um indicativo de acúmulo de sais ou minerais no processo de crescimento (de Assis *et al.*, 2017; De Souza *et al.*, 2020).

O conteúdo de carbono orgânico total ($40,8 \pm 0,6\%$) reforça a predominância de compostos orgânicos na biomassa e, juntamente com o baixo carbono fixo ($1,2 \pm 1,1\%$), aponta

para uma fração orgânica predominantemente volátil. O fósforo ($1,7 \pm 0,4\%$) também está presente em concentração relevante, o que pode refletir sua absorção do meio e integração estrutural em componentes celulares, como fosfolipídios e ácidos nucleicos (Gao *et al.*, 2018).

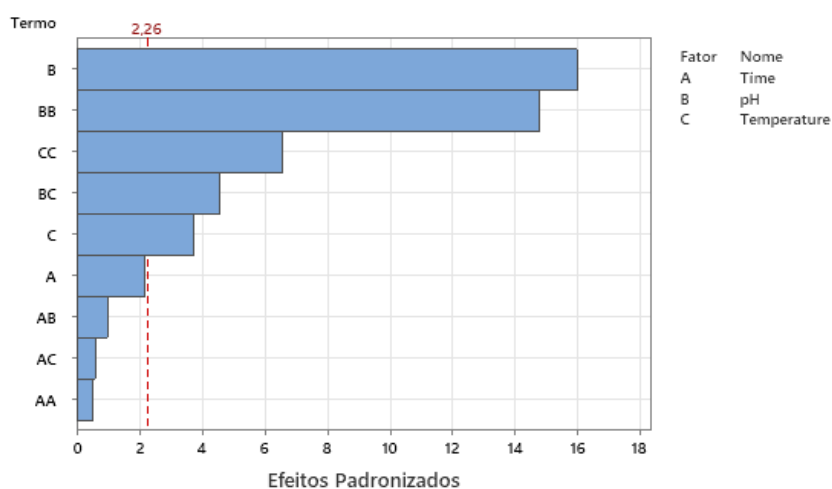
Tabela 7 – Caracterização da biomassa de microalgas produzida neste estudo.

Parâmetros	(%)
Cinzas	$14,6 \pm 1,4$
Umidade	$7,5 \pm 0,5$
Matéria volátil	$76,7 \pm 1,2$
Carbono fixo	$1,2 \pm 1,1$
Fósforo	$1,7 \pm 0,4$
Carbono orgânico total	$40,8 \pm 0,6$

6.3.3 Extração de proteínas

O delineamento experimental pela matriz Doehlert explorou as variáveis tempo, pH e temperatura, com o objetivo de maximizar a quantidade de proteína extraída (Tabela 8). A análise de regressão de superfície de resposta revelou que o modelo foi significativo, com um R^2 de 98,42%, o que indica um bom ajuste aos dados (Apêndice: Tabelas S3 – S6). Os fatores pH e temperatura, juntamente com seus efeitos quadráticos e a interação entre eles, demonstraram ter influência significativa na extração de proteína. O gráfico de Pareto destacou a importância do pH, da temperatura e de suas interações no processo (Figura 5).

Figura 5 – Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis de entrada.



Fonte: elaboração própria com uso do Minitab Statistical Software 22

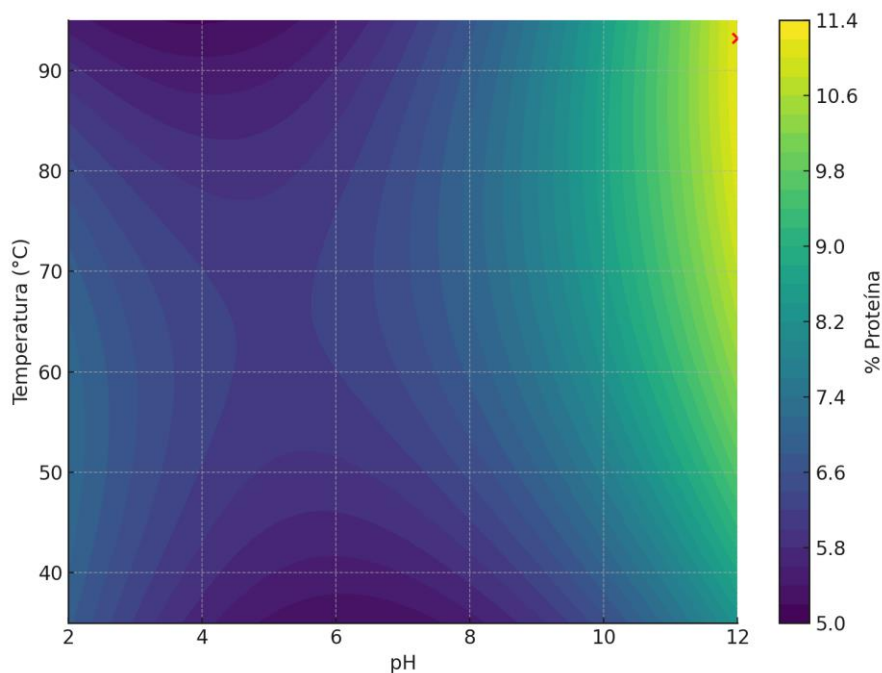
Tabela 8. Delineamento experimental para extração de proteína da biomassa de microalgas e resultados da extração de proteína.

ID	Fatores			Resposta
	pH	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Proteína (%)
1	7,0	50	65	6,80
2	12,0	40	65	10,61
3	8,7	40	95	7,28
4	7,0	10	65	6,02
5	2,0	20	65	6,68
6	5,3	20	35	5,33
7	2,0	40	65	7,18
8	5,3	40	35	5,34
9	12,0	20	65	10,62
10	10,3	30	35	6,62
11	8,7	20	95	7,12
12	3,7	30	95	5,30
13	7,0	30	65	7,07
14	7,0	30	65	6,46
15	7,0	30	65	6,51
16	7,0	30	65	6,49
17	7,0	30	65	6,42
18	7,0	30	65	6,13
19	7,0	30	65	6,51

A otimização da resposta indicou que a melhor condição para maximizar a extração de proteína é com um tempo de 47,17 minutos, pH de 12 e temperatura de 93,18 °C. Nessas condições, a predição do modelo foi de 11,3% de proteína extraída. Isso significa que, dentro da combinação ideal dos fatores mais significativos (pH e Temperatura), o tempo de 47,17 minutos é o que complementa a combinação para a predição máxima, mesmo que o efeito direto do tempo não seja estatisticamente forte comparado aos demais fatores da faixa testada.

A Figura 6 apresenta o gráfico de contorno com curvas de níveis em função das variáveis pH e temperatura. O valor de tempo foi mantido constante em 30 min (ponto central do delineamento experimental) para visualização do efeito dos demais fatores. O estudo demonstra que o pH e a temperatura foram parâmetros críticos na extração de proteína da biomassa e, que a combinação de altos valores desses fatores pode levar a uma maior eficiência no processo de extração. É importante notar que estas são as condições ótimas dentro da faixa de valores testados no experimento.

Figura 6 – Gráfico de contorno com curvas de níveis em função das variáveis pH e temperatura, com valor de tempo constante em 30 min (ponto central do delineamento experimental).



Fonte: elaboração própria

Experimentos foram conduzidos para validação do modelo, os pontos experimentais abrangeram três faixas de pH (4, 8 e 12), três faixas de temperatura (40, 49 e 60°C) e três faixas de tempo (15, 25 e 50 min), além do ponto ótimo encontrado pelo modelo (pH 12, 93°C e 47 min). Esses pontos foram definidos para testar a robustez do modelo em diferentes regiões do espaço experimental, incluindo as condições centrais, extremas e de otimização do modelo. Os valores de proteína preditos pelo software e seus intervalos foram comparados aos resultados experimentais obtidos (Tabela 9).

Para o Teste 1 (tempo = 50 min, pH = 12, temperatura = 49 °C), o modelo subestimou os resultados de validação. Os valores observados ($11,3 \pm 0,26$) foram consistentemente mais altos que os preditos e estavam fora do intervalo de predição de 95% (8,22 - 10,57%).

Para o Teste 2 (tempo = 15 min, pH = 8, temperatura = 40 °C), o modelo apresentou boa concordância com os resultados de validação. O mesmo ocorreu para o Teste 3 (tempo = 25 min, pH = 4, temperatura = 60 °C), em que a média dos valores observados estava dentro do intervalo de predição. Nas condições de otimização (Teste 4), o modelo subestimou a extração de proteína observada no teste de validação ($13,07 \pm 0,26\%$), com valor predito de 11,23% e intervalo de predição entre 10,15 e 12,41%.

Tabela 9 – Experimentos realizados para validação do modelo de extração de proteínas.

Teste	Condição experimental			Proteína (%)		
	Tempo	pH	Temperatura	Observado	Predito	Intervalo de Predição (95%)
1	50	12	49	11,1		
	50	12	49	11,4	9,398	8,22 - 10,57
	50	12	49	11,6		
2	15	8	40	5,5		
	15	8	40	5,2	5,741	4,91 - 6,57
	15	8	40	5,2		
3	25	4	60	5,4		
	25	4	60	5,4	6,179	5,54 - 6,82
	25	4	60	6,1		
4	47	12	93	13,01		
	47	12	93	13,3		
	47	12	93	12,78	11,278	10,15 – 12,41
	47	12	93	13,2		

A análise sugere que, embora o modelo de regressão de superfície de resposta tivesse um alto R^2 (98,42%), indicando um bom ajuste aos dados experimentais utilizados para construí-lo, sua capacidade de predição pode variar em diferentes regiões do espaço experimental. Em particular, ele parece menos preciso nas condições de pH e temperatura elevados e subestima o potencial de extração de proteína nas condições otimizadas. Isso pode indicar que o modelo, embora bem ajustado aos dados iniciais, pode não capturar completamente a relação complexa entre as variáveis na parte superior do espaço experimental.

Essa subestimação sugere que a verdadeira condição ótima para maximizar a extração de proteína pode ser ligeiramente diferente daquela predita, e o rendimento máximo de proteína alcançável pode ser maior do que a previsão de 11,3% do modelo. A imprecisão do modelo em condições extremas do espaço experimental indica que precauções devem ser tomadas ao extrapolar as conclusões para fora da faixa dos dados iniciais ou ao implementar o processo em escala industrial, onde variações podem ocorrer.

O tempo ótimo de 47 minutos pode ser comparado com outros estudos. Wang et al. (2024) observaram que a eficiência de extração aumentou com o tempo e estabilizou após 60 minutos. Ng et al. (2024) encontraram um aumento na eficiência até 60 minutos, com um platô depois. Safi et al. (2015) observaram aumento na concentração de proteína e pigmentos com o tempo em diferentes métodos de extração.

A extração alcalina é eficaz para solubilizar proteínas, como demonstrado em outros estudos (Hildebrand *et al.*, 2020; Ng, Jun Wei *et al.*, 2024; Safi *et al.*, 2015). No estudo de Safi *et al.* (2015) a hidrólise química a 40°C com solução alcalina (NaOH) enfraqueceu lentamente a parede celular da *C. vulgaris*, e permitiu a recuperação de proteínas ($26 \pm 0.8\%$) ligadas à parede celular e algumas proteínas citoplasmáticas de menor tamanho. No entanto, esta técnica não conseguiu penetrar a bicamada fosfolipídica do cloroplasto, onde os pigmentos estão localizados, resultando na ausência de pigmentos na fase aquosa. A difusão de proteínas inicialmente foi rápida, mas tornou-se muito lenta com o tempo, sugerindo uma difusão dificultada dentro de poros e confirmando que não ocorreu ruptura celular completa. Observações microscópicas mostraram células intactas após este tratamento.

Ng *et al.* (2024) investigaram uma abordagem integrada de moagem a seco com esferas e solubilização alcalina para aumentar a recuperação de proteínas da microalga *C. vulgaris*. Sem a etapa de moagem com esferas, o rendimento de extração de proteínas a 37°C foi de 5,0% com água e 16,8% com NaOH 0,1 M, com concentração de biomassa de 20 g.L⁻¹. A abordagem integrada melhorou significativamente os resultados, alcançando um rendimento máximo de extração de proteínas de cerca de 47,3% com concentração de biomassa de 100 g.L⁻¹. A significância da moagem com esferas reside na sua capacidade de romper a parede celular rígida da microalga, melhorando a liberação de proteínas para o meio de extração. O tratamento alcalino auxilia ainda mais na quebra das células e promove a solubilização das proteínas.

A variação na estrutura da parede celular, conteúdo de proteína e solubilidade em consórcios pode tornar a extração mais desafiadora. Os estudos descritos anteriormente focam em espécies únicas, o que pode facilitar a otimização do processo. É importante considerar que a comparação direta entre as pesquisas é limitada pelas diferenças nas espécies de microalgas, métodos de extração e condições experimentais. No entanto, a análise comparativa permite identificar tendências e desafios comuns na extração de proteínas de microalgas, contribuindo para o desenvolvimento de métodos mais eficientes e sustentáveis.

6.3.4 Bioplástico

6.3.4.1 Biomassa de microalgas

No primeiro experimento para a formação de bioplástico com a biomassa, foi avaliada a influência das relações biomassa/gelatina (25, 50 e 75%), concentração de glicerol (0,4, 0,6 e 0,8 g), temperatura (60, 70 e 80 °C) e tempo (10, 20 e 30 min) na formação dos filmes. Somente o bioplástico 4 (50% biomassa/50% gelatina, 0,4 g glicerol, 70 °C, 30 min) não formou um

filme de aparência regular, pois ficou quebradiço (Tabela 10). Por observação visual foi possível perceber que quanto menor a proporção de gelatina, mais maleáveis eram os plásticos formados.

A maioria das combinações testadas com a biomassa não resultou em plásticos resistentes à água o suficiente para completar o teste de intumescimento, e as ocorrências de não-resposta limitaram a disponibilidade de dados válidos. Diante disso, a base para uma análise estatística foi comprometida.

Tabela 10 – Resultados visuais e de intumescimento após 2 e 45 min do experimento para avaliação da influência da proporção de glicerol, gelatina/biomassa, temperatura e tempo na formação de bioplástico produzidos com a biomassa de microalgas.

ID	Observação visual	Intumescimento (%)	
		2 min	45 min
1	Visualmente homogêneo	75 ± 20	-
2	Visualmente homogêneo	78 ± 11	-
3	Visualmente homogêneo	70 ± 7	333 ± 16
4	Não formou filme	-	-
5	Visualmente homogêneo	56 ± 5	-
6	Visualmente homogêneo	-	-
7	Visualmente homogêneo	61 ± 0,06	-
8	Visualmente homogêneo	44 ± 2	-
9	Visualmente homogêneo	38 ± 9	-

O bioplástico 6 (50% biomassa/50% gelatina, 0,8 g glicerol, 60 °C, 20 min), não resistiu à primeira imersão e não passou por nenhuma pesagem após o início da análise. Os bioplásticos 1, 2, 5, 7 - 9 se desfizeram após a primeira pesagem (2 min) e não foi possível prosseguir com a análise de intumescimento. Apenas o plástico 3 (25% biomassa/75% gelatina, 0,8 g glicerol, 80 °C, 30 min) formou um plástico com aparência regular que permitiu medir a absorção de água após 2, 15 e 45 minutos de imersão, com intumescimento igual a 333 ± 16% após 45 minutos.

A alta taxa de solubilização dos filmes indica que a integridade do material é um desafio crucial para o desenvolvimento de bioplásticos funcionais a partir desta biomassa. O desempenho observado no bioplástico ID 3, entretanto, oferece um ponto de partida promissor, sugerindo que certas combinações de fatores podem favorecer a formação de uma matriz polimérica mais estável que, embora possua um alto índice de intumescimento, mantém sua integridade.

A biomassa microalgal contém uma mistura complexa de componentes — proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos, fragmentos celulares e compostos minerais (Lutzu *et al.*, 2021; Roy Chong *et al.*, 2022). Essa heterogeneidade pode ter resultado em baixa coesividade e fraca formação de matriz polimérica contínua, necessária para a integridade dos filmes. Por outro lado, a alta proporção de gelatina e as condições térmicas prolongadas possivelmente favoreceram interações estruturais mais estáveis (González-Balderas *et al.*, 2020), como observado no único filme que se manteve íntegro ao final do teste

Para melhorar a resistência à imersão em água dos filmes produzidos com a biomassa de microalgas e expandir seu campo de aplicação, recomenda-se experimentos com novas abordagens, como por exemplo: 1) extração de frações com maior atividade filmógena, como as proteínas. Este passo reduziria a heterogeneidade da matéria-prima e concentraria os componentes mais aptos a formar redes poliméricas estáveis. 2) Incorporação de aditivos reticulantes para promover ligações entre as cadeias poliméricas da biomassa e da gelatina, o que pode aumentar a resistência mecânica e à água (Mubarak Aldawsari *et al.*, 2023). 3) Aplicação de métodos de processamento alternativos, como prensagem a quente ou moldagem por injeção. Esses métodos, que geralmente envolvem condições de maior cisalhamento e pressão, podem favorecer a homogeneização e a formação de redes poliméricas mais densas e interligadas (Iyer *et al.*, 2023). 4) Modificação do pH do meio para influenciar a conformação estrutural das proteínas e expor sítios funcionais, o que pode favorecer a formação de interações intermoleculares mais fortes (como ligações iônicas e de hidrogênio) e promover a reticulação entre as cadeias poliméricas (González-Balderas *et al.*, 2020; Lutzu *et al.*, 2021). 5) Delineamento experimental mais abrangente, para testar outras combinações dos fatores selecionados.

6.3.4.2 Solução proteica de microalgas

No teste de intumescimento com os bioplásticos produzidos com a SPM, os testes de ID 6 (50% biomassa/50% gelatina, 0,8 g glicerol, 60 °C, 20 min) e 8 (75% biomassa/50% gelatina, 0,6 g glicerol, 60 °C, 30 min) não formaram filmes homogêneos, o que demonstra que essas combinações específicas de proporções e condições não foram adequadas. Os plásticos 2 e 4 não resistiram à primeira imersão e o plástico 1 resistiu apenas à primeira pesagem (2 min). Os demais plásticos (3, 5, 7 e 9) se mantiveram íntegros após 45 min de teste (Tabela 11). Por observação visual também foi possível perceber que quanto menor a proporção de gelatina, mais maleáveis eram os plásticos formados. As ocorrências de não-resposta também limitaram

a disponibilidade de dados válidos para o experimento, e diante disso, não foi possível realizar uma análise estatística válida.

Tabela 11 – Resultados visuais e de intumescimento após 2 e 45 min do experimento para avaliação da influência da proporção de glicerol, gelatina/biomassa, temperatura e tempo na formação de bioplástico produzidos com a solução proteica de microalgas.

ID	Observação visual	Intumescimento (%)	
		2 min	45 min
1	Visualmente homogêneo	66 ± 16	-
2	Visualmente homogêneo	-	-
3	Visualmente homogêneo	73 ± 10	646 ± 174
4	Visualmente homogêneo	-	-
5	Visualmente homogêneo	130 ± 15	659 ± 40
6	Não formou filme	-	-
7	Visualmente homogêneo	198 ± 44	502 ± 83
8	Não formou filme	-	-
9	Visualmente homogêneo	181 ± 32	464 ± 9

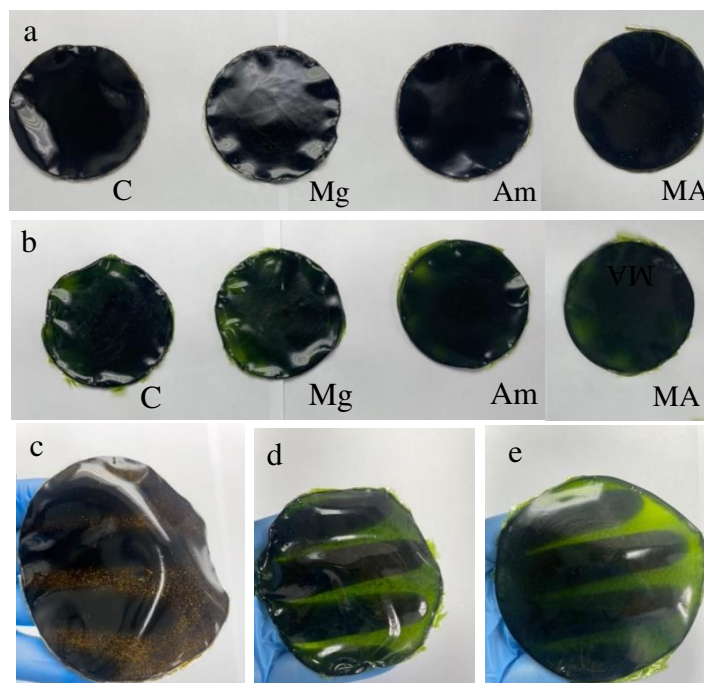
Neste experimento, a maioria das combinações resultou em plásticos visualmente homogêneos que resistiu ao teste de intumescimento por 45 minutos. Os plásticos com maior resistência à água foram obtidos quando processados a temperaturas mais altas, o que favoreceu a reticulação e o aumento da rede de proteínas. Outros autores encontraram resultados semelhantes (Fernández-Espada *et al.*, 2016; González-Balderas *et al.*, 2020).

Foi possível observar diferentes graus de intumescimento para os plásticos que se mantiveram íntegros. Como o plástico 9 (75% biomassa/25% gelatina, 0,8 g glicerol, 70 °C, 10 min) continha maior proporção de biomassa na SPM em comparação aos plásticos 3 (25% biomassa) e 5 (50% biomassa), e menores temperatura e tempo de preparo em relação ao plástico 7 (80°C, 20 min), ele foi selecionado para prosseguimento dos testes.

6.3.4.3 Adição de compósitos ao bioplástico

Os plásticos com maior resistência à imersão em água e menor grau de intumescimento das seções 6.3.4.1 (ID 3 = 25% biomassa/75% gelatina, 0,8 g glicerol, 80 °C, 30 min) e 6.3.4.2 (ID 9 = 75% biomassa/25% gelatina, 0,8 g glicerol, 70 °C, 10 min), denominados ‘Controle’, foram selecionados para adição de MgO (1% m/m), amido de milho (5% m/m) e MgO + amido de milho (1 e 5% m/m, respectivamente), conforme detalhado na Tabela 3. Todas as oito composições formaram plásticos de aparência regular (Figura 7a e 7b). Os plásticos produzidos com a biomassa apresentaram espessura média de $0,55 \pm 0,029$ mm. Os plásticos produzidos com a SPM, tiveram espessura média de $0,37 \pm 0,032$ mm.

Figura 7 – Plásticos produzidos com adição de óxido de magnésio e amido de milho. (a) Plásticos produzidos com a biomassa. (b) Plásticos produzidos com a solução proteica de microalgas (SPM). (c) Plástico controle (biomassa – sem aditivos). (d) Plástico controle (SPM – sem aditivos). (e) MA – Plástico de SPM com adição de MgO + amido de milho.



C: plásticos controle. Mg: plásticos com adição de MgO (1% m/m). Am: plásticos com adição de amido de milho (5% m/m), MA: plásticos com adição conjunta de MgO (1% m/m) e amido de milho (5% m/m).

Fonte: elaboração própria

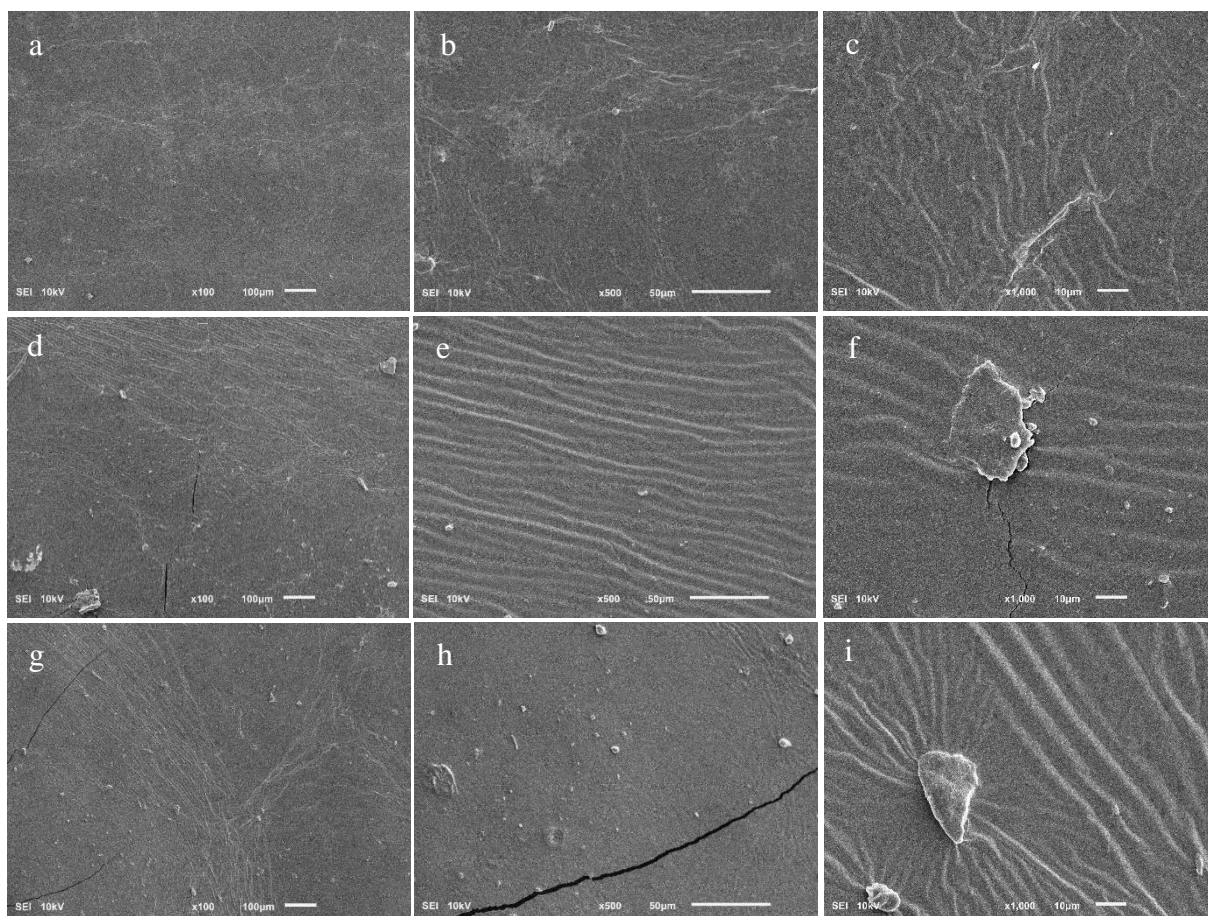
O único plástico que resistiu aos 45 minutos do ensaio de intumescimento com a biomassa foi o controle ($227 \pm 1,4\%$) (Figura 7c). Já no teste com a SPM, os plásticos do controle (Figura 7d) e a formulação com óxido de magnésio + amido de milho (Figura 7e) alcançaram o final do teste, com índices de $467 \pm 8,5\%$ e $551 \pm 43\%$, respectivamente. Neste experimento, a adição separada de amido de milho e MgO aos bioplásticos não conferiu maior resistência à imersão em água em nenhum plástico (biomassa ou SPM). A melhor combinação foi a adição conjunta de amido de milho e MgO ao plástico de SPM, que, assim como o controle, não solubilizou em água após 45 minutos de teste.

6.3.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias das amostras de bioplástico são apresentadas na Figura 8. O bioplástico sintetizado com a biomassa exibiu uma superfície mais homogênea, sem rachaduras, em comparação com os plásticos sintetizados com a SPM. Esses últimos apresentaram pontos de

falha e de aglomeração de partículas, indicando má dispersão, agregação ou menor integração dos compósitos adicionados à formulação dos plásticos.

Figura 8 – Imagens MEV dos bioplásticos de microalgas. (a), (b) e (c) plástico controle produzido com a biomassa, 100x, 500x e 1000x. (d), (e) e (f) plástico controle produzido com SPM, 100x, 500x e 1000x. (g), (h) e (i) plástico produzido com a SPM com adição conjunta de MgO e amido de milho 100x, 500x e 1000x.



6.3.4.5 Ensaio de germinação com sementes de rúcula

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos no ensaio de germinação com os bioplásticos. Os resultados da ANOVA não indicaram diferenças estatisticamente significativas ($\alpha = 0,05$) no comprimento das radículas entre o controle (água purificada) e os tratamentos com bioplástico. O tratamento com biomassa resultou em 100% de germinação, mas o crescimento relativo da radícula (CRR) de 0,79 indica inibição no crescimento da raiz. O índice de germinação (IG) de 78,8 classifica o tratamento como moderadamente fitotóxico. O tratamento com bioplástico de SPM apresentou 88,9% de germinação e um CRR de 0,70, o que

também indica inibição no crescimento da raiz. O IG de 62 classifica este tratamento como moderadamente fitotóxico. O tratamento com bioplástico de SPM e adição conjunta de MgO e amido de milho resultou em 100% de germinação e um CRR de 1,06, o que indica nenhum efeito significativo no crescimento da raiz. O IG de 106 sugere que este tratamento potencializa a germinação. O amido de milho e o magnésio podem ter causado um efeito benéfico ao desenvolvimento das radículas.

Tabela 12 – Comprimento das radículas, índice de germinação absoluta (GA), crescimento relativo da radícula (CRR) e índice de germinação (IG) calculados no experimento de germinação de sementes de rúcula expostas aos extratos dos bioplásticos produzidos. (Valores médios e desvio padrão, n= 3)

Tratamento	Comprimento (mm)	GA (%)	CRR	IG
Controle	27,8 ± 7,95	-	-	-
Bioplástico de biomassa	21,9 ± 11,44	100	0,79	78,8
Bioplástico de SPM	19,4 ± 9,43	88,9	0,70	62
Bioplástico de SPM com MgO + amido de milho	29,6 ± 13,21	100	1,06	106

Embora os resultados não tenham revelado diferenças estatisticamente significativas a nível de 5% no comprimento das radículas entre o controle e os tratamentos com bioplástico, as tendências observadas nas médias dos grupos (menor crescimento com biomassa completa e proteína solubilizada, e maior crescimento com MgO + amido de milho) são consistentes com as classificações de toxicidade (inibição e potencialização) obtidas com base nos parâmetros CRR e IG.

6.4 Conclusão

Este estudo demonstrou a viabilidade da produção de biomassa microalgal em esgoto sanitário de tanque séptico, com remoção de atividade estrogênica na fase sólida e produção de biomassa rica em proteínas que pode ser usada para a produção de bioplásticos. O estudo fornece informações relevantes sobre a influência de pH, temperatura e tempo na extração de proteínas de consórcios de microalgas-bactérias, com ponto ótimo de 93°C, 47 min e pH de 12. Nessas condições, a predição do modelo foi de 11,3% de proteína extraída, com concentração inicial de 4 g.L⁻¹ de biomassa. Os resultados podem ser usados para aprimorar o processo com a otimização de carga de biomassa aplicada e combinar os fatores identificados com algum método de quebra celular, como por exemplo, a moagem com esferas.

A síntese de bioplásticos visualmente homogêneos a partir da biomassa e da SPM foi bem-sucedida. As nove combinações de tempo, temperatura, proporção de biomassa/gelatina e quantidade de glicerol testadas resultaram em plásticos com baixa resistência à imersão em água, com grande parte se solubilizando em apenas 15 minutos de imersão. Dos nove bioplásticos produzidos com a biomassa de microalgas, apenas um resistiu ao final dos 45 min do teste de intumescimento, com índice de $333 \pm 16\%$. Dos nove plásticos produzidos com a SPM, quatro alcançaram o final do teste de intumescimento, com índices entre 464 e 659%. A adição de MgO e amido de milho aos plásticos com melhores desempenhos não aumentou a resistência dos mesmos à imersão em água, sendo que a combinação conjunta de MgO e amido de milho também alcançou o final do teste de intumescimento, com índice igual a $551 \pm 43\%$.

Os ensaios de germinação alertam para o potencial efeito fitotóxico dos bioplásticos produzidos. No entanto, a formulação conjunta de SPM, MgO e amido de milho demonstrou potencializar a germinação, e indica que a composição do bioplástico pode ser ajustada para mitigar efeitos negativos.

Este trabalho avança no desenvolvimento de uma abordagem sustentável e tecnicamente simples para a produção de bioplásticos a partir de microalgas cultivadas em efluentes. Os resultados obtidos fornecem informações importantes para a otimização dos processos de extração de proteínas e síntese de bioplásticos e abre caminho para futuras pesquisas focadas na melhoria das propriedades dos bioplásticos e na avaliação de sua viabilidade econômica e ambiental em larga escala.

8.3 Referências

ADAMU UGYA, Yunusa; CHEN, Hui; SHENG, Yangyang; AJIBADE, Fidelis Odedishemi; WANG, Qiang. A review of microalgae biofilm as an eco-friendly approach to bioplastics, promoting environmental sustainability. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 236, 1 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116833>.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Standard Methods*, 541 p., 2017.

BASKARAN, Viswanathan; PATIL, Prasanna K.; ANTONY, M. Leo; AVUNJE, Satheesha; NAGARAJU, Vinay T.; GHATE, Sudeep D.; NATHAMUNI, Suganya; DINESHKUMAR, N.; ALAVANDI, Shankar V.; VIJAYAN, Kizhakedath K. Microbial community profiling of ammonia and nitrite oxidizing bacterial enrichments from brackishwater ecosystems for mitigating nitrogen species. *Scientific Reports*, [s. l.], vol. 10, no. 1, 1 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62183-9>.

BEN, Zhu Ying; SAMSUDIN, Hayati; YHAYA, Mohd Firdaus. Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch based films. *European Polymer Journal*, [s. l.], vol. 175, p. 111377, Jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111377>.

CALIJURI, Maria Lúcia; SILVA, Thiago Abrantes; MAGALHÃES, Iara Barbosa; PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula; MARANGON, Bianca Barros; ASSIS, Letícia Rodrigues de; LORENTZ, Juliana Ferreira. Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 305, p. 135508, Oct. 2022. DOI 10.1016/j.chemosphere.2022.135508. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565352202001X>.

CIAPPONI, Riccardo; TURRI, Stefano; LEVI, Marinella. Mechanical reinforcement by microalgal biofiller in novel thermoplastic biocompounds from plasticized gluten. *Materials*, [s. l.], vol. 12, no. 9, 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12091476>.

COUTO, Eduardo; CALIJURI, Maria Lúcia; ASSEMANY, Paula; CECON, Paulo Roberto. Evaluation of high rate ponds operational and design strategies for algal biomass production and domestic wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 791, 15 Oct. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148362>.

DE ASSIS, Letícia Rodrigues; CALIJURI, Maria Lúcia; DO COUTO, Eduardo de Aguiar; ASSEMANY, Paula Peixoto. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. *Ecological Engineering*, [s. l.], vol. 106, p. 191–199, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.05.040>.

DE SOUZA, Rafael Augusto Sotana; SALDANHA-CORRÊA, Flávia Marisa Prado; GALLEGO, Antonio Garrido; NETO, Ana Maria Pereira. Semi-quantitative determination of ash element content for freeze-dried, defatted, sulfated and pyrolysed biomass of *Scenedesmus* sp. *Biotechnology for Biofuels*, [s. l.], vol. 13, no. 1, 1 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01699-8>.

DUBOIS, Michel.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, [s. l.], vol. 28, no. 3, p. 350–356, 1 Mar. 1956. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

FERNÁNDEZ-ESPADA, Lucía; BENGOCHEA, Carlos; CORDOBÉS, Felipe; GUERRERO, Antonio. Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding. *Journal of Applied Polymer Science*, [s. l.], vol. 133, no. 24, 20 Jun. 2016. <https://doi.org/10.1002/app.43524>.

GAO, Baoyan; LIU, Jing; ZHANG, Chengwu; VAN DE WAAL, Dedmer B. Biological stoichiometry of oleaginous microalgal lipid synthesis: The role of N:P supply ratios and growth rate on microalgal elemental and biochemical composition. *Algal Research*, [s. l.], vol. 32, p. 353–361, 1 Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.019>.

GERRITSEN, Jacqueline; HORNING, Bastian; RITARI, Jarmo; PAULIN, Lars; RIJKERS, Ger T.; SCHAAP, Peter J.; DE VOS, Willem M.; SMIDT, Hauke. A comparative and functional genomics analysis of the genus *Romboutsia* provides insight into adaptation to an intestinal lifestyle. [s. l.], 17 Nov. 2019. DOI 10.1101/845511. Available at: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/845511>.

GONZÁLEZ-BALDERAS, R. M.; FELIX, M.; BENGOCHEA, C.; GUERRERO, A.; ORTA LEDESMA, M. T. Influence of mold temperature on the properties of wastewater-grown microalgae-based plastics processed by injection molding. *Algal Research*, [s. l.], vol. 51, 1 Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102055>.

GONZÁLEZ-GARCINUÑO, Álvaro; TABERNERO, Antonio; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, José Ma; MARTIN DEL VALLE, Eva M.; GALÁN, Miguel A. Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea*. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 173, p. 334–341, 1 Dec. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.038>.

HILDEBRAND, Gunda; POOJARY, Mahesha M.; O'DONNELL, Colm; LUND, Marianne N.; GARCIA-VAQUERO, Marco; TIWARI, Brijesh K. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, [s. l.], vol. 32, no. 3, p. 1709–1718, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>.

HOEBLER, Christine; BARRY, Jean Luc; DAVID, Agnes; DELORT-LAVAL, Jean. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], vol. 37, no. 2, p. 360–367, 1 Mar. 1989. <https://doi.org/10.1021/jf00086a020>.

IYER, Hareesh; GRANDGEORGE, Paul; JIMENEZ, Andrew M.; CAMPBELL, Ian R.; PARKER, Mallory; HOLDEN, Michael; VENKATESH, Mathangi; NELSEN, Marissa; NGUYEN, Bichlien; ROUMELI, Eleftheria. Fabricating Strong and Stiff Bioplastics from Whole *Spirulina* Cells. *Advanced Functional Materials*, [s. l.], 2 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1002/adfm.202302067>.

JIMÉNEZ-ROSADO, M.; RUBIO-VALLE, J.F.; PEREZ-PUYANA, V.; GUERRERO, A.; ROMERO, A. Use of heat treatment for the development of protein-based bioplastics.

Sustainable Chemistry and Pharmacy, [s. l.], vol. 18, p. 100341, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100341>.

LEITE, Inacio de sá; PINTO JR, Wilson Rodrigues; SILVA, Leonardo de Araújo. Biofilme a partir de gelatina e glicerol com a adição de íons de prata como agente antimicrobiano. Latin American Journal of Energy Research, [s. l.], vol. 6, no. 2, p. 1–11, 29 Jan. 2020. <https://doi.org/10.21712/lajer.2019.v6.n2.p1-11>.

LIU, X.; WANG, Kaijun; WANG, Jingyao; ZUO, J.; PENG, Fei; WU, Jing; SAN, Erfu. Carbon dioxide fixation coupled with ammonium uptake by immobilized *Scenedesmus obliquus* and its potential for protein production. Bioresource Technology, [s. l.], vol. 289, 1 Oct. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121685>.

LÓPEZ ROCHA, César Javier; ÁLVAREZ-CASTILLO, Estefanía; ESTRADA YÁÑEZ, Mirna Rosa; BENGOCHEA, Carlos; GUERRERO, Antonio; ORTA LEDESMA, María Teresa. Development of bioplastics from a microalgae consortium from wastewater. Journal of Environmental Management, [s. l.], vol. 263, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110353>.

LUTZU, Giovanni Antonio; CIURLI, Adriana; CHIELLINI, Carolina; DI CAPRIO, Fabrizio; CONCAS, Alessandro; DUNFORD, Nurhan Turgut. Latest developments in wastewater treatment and biopolymer production by microalgae. Journal of Environmental Chemical Engineering, [s. l.], vol. 9, no. 1, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104926>.

MOREIRA, Ana S.P.; GONÇALVES, Joana; SOUSA, Francisco; MAIA, Inês; PEREIRA, Hugo; SILVA, Joana; COIMBRA, Manuel A.; FERREIRA, Paula; NUNES, Cláudia. Potential of Coccolithophore Microalgae as Fillers in Starch-Based Films for Active and Sustainable Food Packaging. Foods, [s. l.], vol. 12, no. 3, 1 Feb. 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12030513>.

MUBARAK ALDAWSARI, Hibah; KOTTA, Sabna; ASFOUR, Hani Z.; VATTAMKANDATHIL, Sajith; ABDELKHALEK ELFAKY, Mahmoud; ASHRI, Lubna Y.; BADR-ELDIN, Shaimaa M. Development and evaluation of quercetin enriched bentonite-reinforced starch-gelatin based bioplastic with antimicrobial property. Saudi Pharmaceutical Journal, [s. l.], vol. 31, no. 12, p. 101861, Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101861>.

NG, Jun Wei; TEH, Tong Mei; MELANIE, Weingarten; TALUKDER, Md Mahabubur Rahman. Integrating bead milling and alkaline solubilization for enhanced protein recovery from microalgae: A comprehensive approach. Future Foods, [s. l.], vol. 9, 1 Jun. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100385>.

PEDUTO, Thais Araujo Goya; JESUS, Tatiane Araújo de; KOHATSU, Marcio Yukihiro. Sensibilidade de diferentes sementes em ensaio de fitotoxicidade. Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação, [s. l.], vol. 4, no. 2, p. 200, 30 Sep. 2019. <https://doi.org/10.18554/rbcti.v4i2.3698>.

RAJPOOT, Aman Singh; CHOUDHARY, Tushar; CHELLADURAI, H.; NATH VERMA, Tikendra; SHENDE, Vikas. A comprehensive review on bioplastic production from

microalgae. *Materials Today: Proceedings*, [s. l.], vol. 56, p. 171–178, 1 Jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.060>.

RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, [s. l.], vol. 88, no. 10, p. 3411–3424, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>.

ROY CHONG, Jun Wei; TAN, Xuefei; KHOO, Kuan Shiong; NG, Hui Suan; JONGLERTJUNYA, Woranart; YEW, Guo Yong; SHOW, Pau Loke. Microalgae-based bioplastics: Future solution towards mitigation of plastic wastes. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 206, 15 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112620>.

SAFI, Carl; FRANCES, Christine; URSU, Alina Violeta; LAROCHE, Céline; POUZET, Cécile; VACA-GARCIA, Carlos; PONTALIER, Pierre Yves. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Research*, [s. l.], vol. 8, p. 61–68, 1 Mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.002>.

SANTIAGO, Aníbal Fonseca; CALIJURI, Maria Lucia; ASSEMANY, Paula Peixoto; CALIJURI, Maria do Carmo; REIS, Alberto José Delgado dos. Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent. *Environmental Technology*, [s. l.], vol. 34, no. 13–14, p. 1877–1885, Jul. 2013. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.812670>.

TENNAKOON, Pipuni; CHANDIKA, Pathum; YI, Myunggi; JUNG, Won-Kyo. Marine-derived biopolymers as potential bioplastics, an eco-friendly alternative. *iScience*, [s. l.], vol. 26, no. 4, 2023. DOI 10.1016/j.isci. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci>.

VASSALLE, Lucas; GARCÍA-GALÁN, María Jesús; AQUINO, Sérgio F.; AFONSO, Robson José de Cássia Franco; FERRER, Ivet; PASSOS, Fabiana; R MOTA, Cesar. Can high rate algal ponds be used as post-treatment of UASB reactors to remove micropollutants? *Chemosphere*, [s. l.], vol. 248, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125969>.

WANG, Zijing; YE, Wangfang; WU, Yijing; LIN, Xiaoyu; LUAN, Cuirong; XIE, Xiaowei; PENG, Yue; SUN, Xiaohong; SHI, Chuangyang; LV, Yuancai; SHEN, Jianlin; ASTATKIE, Tess; HE, Quan (Sophia); LI, Zhiyu; YANG, Jie. Protein extraction from *Chlorella pyrenoidosa* microalgae: Green methodologies, functional assessment, and waste stream valorization for bioenergy production. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 397, 1 Apr. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130508>.

YANG, Jin Hoon; HONG, Joung Sook; LEE, Jeong Seop; SIM, Sang Jun; AHN, Kyung Hyun. Dispersion of unfractionated CO₂-derived protein-rich microalgae (*Chlorella* sp. HS2) for ecofriendly polymer composite fabrication. *Materials Today Communications*, [s. l.], vol. 31, 1 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103769>.

YOUNG, Brian Jonathan; RIERA, Nicolás Iván; BEILY, María Eugenia; BRES, Patricia Alina; CRESPO, Diana Cristina; RONCO, Alicia Estela. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 76, p. 182–186, Feb. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019>.

ZHONG, Weizhang; ZHANG, Zhongzhi; LUO, Yijing; QIAO, Wei; XIAO, Meng; ZHANG, Min. Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 114, p. 281–286, Jun. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.111>.

7 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho confirmou a eficácia do tratamento com consórcio microalgas-bactérias na remoção da toxicidade e da atividade estrogênica de efluentes sanitários tratados por reator anaeróbio. O tratamento com consórcio foi capaz de eliminar completamente a toxicidade aguda e crônica à sobrevivência de *C. dubia*, entretanto o aumento na toxicidade crônica à reprodução aponta para a necessidade de estudos adicionais sobre esse aspecto. Os compostos responsáveis pela atividade estrogênica do esgoto foram biodegradados pelo consórcio nas primeiras horas de tratamento. Em 48 h, esses compostos foram removidos da fração dissolvida e dos sólidos acima de 0,7 μm , até o limite de detecção e na fração de sólidos entre 0,45 e 0,7 μm , a remoção atingiu 94,7% de eficiência. A biodegradação por microrganismos heterotróficos do próprio efluente mostrou-se como o principal mecanismo de remoção da atividade estrogênica na fração dissolvida.

Além disso, a viabilidade técnica da produção de bioplásticos a partir da biomassa microalgal foi demonstrada, com destaque para a influência positiva da adição conjunta de óxido de magnésio e amido de milho nos plásticos preparados com solução proteica de microalgas na redução de fitotoxicidade. No entanto, os ensaios de germinação indicaram possível fitotoxicidade nas formulações dos demais plásticos, o que aponta para a necessidade de ajustes nos processos de síntese. Apesar dos avanços, são necessárias análises complementares das propriedades dos bioplásticos, como testes mecânicos, térmicos e de biodegradabilidade, para uma melhor caracterização e definição de aplicação desses materiais. Sugere-se, em trabalhos futuros, a exploração de métodos complementares de extração de proteínas, como a moagem com esferas, associados a processos simplificados de síntese, com o objetivo de otimizar o aproveitamento da biomassa e aprimorar as propriedades dos bioplásticos gerados.

Dessa forma, este estudo contribui para o avanço de abordagens sustentáveis no tratamento de efluentes e na produção de bioprodutos de valor agregado. Os resultados obtidos oferecem subsídios para a otimização dos processos de extração de proteínas e síntese de bioplásticos, além de abrirem perspectivas para o uso da biomassa residual em outras rotas de conversão, como a produção de biocombustíveis. Por fim, pesquisas futuras podem explorar a avaliação integrada de sua viabilidade econômica e ambiental em escala industrial.

REFERÊNCIAS

ADAMU UGYA, Yunusa; CHEN, Hui; SHENG, Yangyang; AJIBADE, Fidelis Odedishemi; WANG, Qiang. A review of microalgae biofilm as an eco-friendly approach to bioplastics, promoting environmental sustainability. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 236, 1 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116833>.

ADITYA, Lisa; MAHLIA, T. M. Indra; NGUYEN, Luong N.; VU, Hang P.; NGHIEM, Long D. Microalgae-bacteria consortium for wastewater treatment and biomass production. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 838, 10 Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155871>.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas. Brasília: ANA, 2017. 88 p. Disponível em: http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/ATLASESGOTOSDespoluicaoodeBaciasHidrograficas-ResumoExecutivo_livro.pdf Acesso em 05.04.2025.

ALAHADEB, Jawaher Ibrahim. Effective biodeterioration of a common endocrine disruptor 17 β -estradiol using mixed microbial cultures isolated from wastewater. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 206, 15 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112559>.

ALVES, Daniela Pereira da Silva; TEIXEIRA, Flaviane Borges; TEÓFILO, Monatha Nayara Guimarães; COTRIM, Carlos Filipe Camilo; DE PAULA SILVA, Junilson Augusto; ALMEIDA, Luciane Madureira; BAILÃO, Elisa Flávia Luiz Cardoso. Use of ecotoxicological bioindicators in effluent monitoring — legal implications in Brazil. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, [s. l.], vol. 29, 2024. <https://doi.org/10.1590/S1413-415220230054>.

ANDRADE, Diva Souza; COLOZZI FILHO, Arnaldo. Microalgas de águas continentais. Londrina: IAPAR, 2014. vol. 3.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Standard Methods*, 541 p., 2017.

ARCANJO, Gemima S.; DOS SANTOS, Carolina R.; CAVALCANTE, Bárbara F.; MOURA, Gabriela de A.; RICCI, Bárbara C.; MOUNTEER, Ann H.; SANTOS, Lucilaine V.S.; QUEIROZ, Luciano M.; AMARAL, Míriam CS. Improving biological removal of pharmaceutical active compounds and estrogenic activity in a mesophilic anaerobic osmotic membrane bioreactor treating municipal sewage. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 301, 1 Aug. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134716>.

ARGOLO, Allan dos Santos; GOMES, Giselle; BILA, Daniele Maia. (Anti)estrogenic activity impacted by complex environmental matrices: A DOM and multiphase distribution approach. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 310, 1 Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136917>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustácea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2022.

ATENGUEÑO-REYES, Karina; VELÁSQUEZ-ORTA, Sharon B.; YÁÑEZ-NOGUEZ, Isaura; MONJE-RAMÍREZ, Ignacio; ORTA-LEDESMA, María Teresa. Removal processes and estrogenic activity of bisphenol—A and triclosan using microalgae. *Algal Research*, [s. l.], vol. 82, 1 Aug. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103670>.

BAI, Xuelian; ACHARYA, Kumud. Removal of seven endocrine disrupting chemicals (EDCs) from municipal wastewater effluents by a freshwater green alga. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 247, p. 534–540, 1 Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.075>.

BAKER, Josh A.; GILRON, Guy; CHALMERS, Ben A.; ELPHICK, James R. Evaluation of the effect of water type on the toxicity of nitrate to aquatic organisms. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 168, p. 435–440, 1 Feb. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.059>.

BANO, Farhat; MALIK, Anushree; AHAMMAD, Shaikh Z. Removal of estradiol, diclofenac, and triclosan by naturally occurring microalgal consortium obtained from wastewater. *Sustainability (Switzerland)*, [s. l.], vol. 13, no. 14, 2 Jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/su13147690>.

BARTON-MACLAREN, T. S.; WADE, M.; BASU, N.; BAYEN, S.; GRUNDY, J.; MARLATT, V.; MOORE, R.; PARENT, L.; PARROTT, J.; GRIGOROVA, P.; PINSONNAULT-COOPER, J.; LANGLOIS, V. S. Innovation in regulatory approaches for endocrine disrupting chemicals: The journey to risk assessment modernization in Canada. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 204, 1 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112225>.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim. Nova*, [s. l.], vol. 30, no. 3, p. 651–666, 2007.

BIRKETT, Jason W.; LESTER, John N. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process*. 1st ed. [S. l.]: Lewis Publishers, 2002.

BRAGA, M. Q.; DE ASSIS, L. R.; FERREIRA, J.; RIBEIRO, V. J.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P. Microalgae cultivation and carotenoid production in paint booth effluent mixed with domestic sewage. *International Journal of Environmental Science and Technology*, [s. l.], 2023. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-05268-y>.

BRANDT, Emanuel M.F.; DE QUEIROZ, Fernanda B.; AFONSO, Robson J.C.F.; AQUINO, Sérgio F.; CHERNICHARO, Carlos A.L. Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], vol. 128, p. 718–726, 15 Oct. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.003>.

BRICIU, Rodica Domnica; KOT-WASIK, Agata; NAMIESNIK, Jacek. Analytical Challenges and Recent Advances in the Determination of Estrogens in Water Environments. *Chromatographic Science*, [s. l.], vol. 47, no. 2, p. 127–139, 2009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/chromsci/47.2.127>.

CALIJURI, Maria Lúcia; SILVA, Thiago Abrantes; MAGALHÃES, Iara Barbosa; PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula; MARANGON, Bianca Barros; ASSIS, Letícia Rodrigues de; LORENTZ, Juliana Ferreira. Bioproducts from microalgae biomass: Technology,

sustainability, challenges and opportunities. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 305, p. 135508, Oct. 2022. DOI 10.1016/j.chemosphere.2022.135508. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565352202001X>.

CHENG, Jun; YE, Qing; LI, Ke; LIU, Jianzhong; ZHOU, Junhu. Removing ethinylestradiol from wastewater by microalgae mutant *Chlorella* PY-ZU1 with CO₂ fixation. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 249, p. 284–289, 1 Feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.036>.

CHENG, Ning; WANG, Bing; WU, Pan; LEE, Xinqing; XING, Ying; CHEN, Miao; GAO, Bin. Adsorption of emerging contaminants from water and wastewater by modified biochar: A review. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 273, 15 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116448>.

CHO, Hyunki; RYU, Chang Seon; LEE, Sang Ah; ADELI, Zahra; MEUPEA, Brenda Tenou; KIM, Youngsam; KIM, Young Jun. Endocrine-disrupting potential and toxicological effect of para-phenylphenol on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 243, 15 Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113965>.

CIAPPONI, Riccardo; TURRI, Stefano; LEVI, Marinella. Mechanical reinforcement by microalgal biofiller in novel thermoplastic biocompounds from plasticized gluten. *Materials*, [s. l.], vol. 12, no. 9, 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12091476>.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL; CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DE MINAS GERAIS. Deliberação Normativa conjunta COPAM / CERH nº 1 de 05 de maio de 2008. Belo Horizonte: COPAM, 2008.

COUTO, Eduardo; CALIJURI, Maria Lúcia; ASSEMANY, Paula; CECON, Paulo Roberto. Evaluation of high rate ponds operational and design strategies for algal biomass production and domestic wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 791, 15 Oct. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148362>.

D'ASCENZO, G; CORCIA, A Di; GENTILI, A; MANCINI, R; MASTROPASQUA, R; NAZZARI, M; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. [S. l.: s. n.], 2003.

DAGNINO, Sonia; GOMEZ, Elena; PICOT, Bernadette; CAVAILLÈS, Vincent; CASELLAS, Claude; BALAGUER, Patrick; FENET, Hélène. Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 408, no. 12, p. 2608–2615, May 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.034>.

DE ASSIS, Letícia Rodrigues; CALIJURI, Maria Lúcia; DO COUTO, Eduardo de Aguiar; ASSEMANY, Paula Peixoto. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. *Ecological Engineering*, [s. l.], vol. 106, p. 191–199, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.05.040>.

DE REZENDE, Amanda Teixeira; MOUNTEER, Ann H. Ecological risk assessment of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian surface waters.

Environmental Pollution, [s. l.], vol. 338, 1 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122628>.

DE SOUZA, Rafael Augusto Sotana; SALDANHA-CORRÊA, Flávia Marisa Prado; GALLEGO, Antonio Garrido; NETO, Ana Maria Pereira. Semi-quantitative determination of ash element content for freeze-dried, defatted, sulfated and pyrolysed biomass of *Scenedesmus* sp. *Biotechnology for Biofuels*, [s. l.], vol. 13, no. 1, 1 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01699-8>.

DIAS, Amanda Cristina Vieira; GOMES, Frederico Wegenast; BILA, Daniele Maia; SANT'ANNA, Geraldo Lippel; DEZOTTI, Marcia. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 120, p. 41–47, 1 Oct. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>.

DOS SANTOS, Carolina Rodrigues; ROSA E SILVA, Guilherme Otávio; DIAS ARAÚJO, Ane Alice; SERAFIM, Thamiris Gualberto; DRUMOND, Guilherme Pinheiro; DOS SANTOS, Vera Lúcia; FERNANDES, Luyara de Almeida; DE ARAÚJO, Juliana Calabria; ARCANJO, Gemima Santos; DE SOUZA SANTOS, Lucilaine Valéria; AMARAL, Míriam Cristina Santos. Granular anaerobic membrane bioreactor coupled hybrid forward osmosis – membrane distillation module for organic matter, nutrient and bisphenol A removal: Integrated assessment of performance, cost, toxicity, and risks. *Chemical Engineering Journal*, [s. l.], vol. 504, 15 Jan. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.158022>.

DUBOIS, Michel.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, [s. l.], vol. 28, no. 3, p. 350–356, 1 Mar. 1956. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

DÜPONT, Adriana; LOBO, Eduardo Alcayaga. Evaluation of the efficiency of the sewage treatment plant from the University of Santa Cruz do Sul (UNISC), RS, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, [s. l.], vol. 24, no. 2, p. 119–126, 6 Sep. 2012. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2012005000031>.

DURCIK, Martina; GROBIN, Andrej; ROŠKAR, Robert; TRONTELJ, Jurij; PETERLIN MAŠIČ, Lucija. Estrogenic potency of endocrine disrupting chemicals and their mixtures detected in environmental waters and wastewaters. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 330, 1 Jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138712>.

EDSTAC. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final>. Acesso em: 8 nov. 2023.

EKPEGHERE, Kalu Ibe; SIM, Won Jin; LEE, Heon Jun; OH, Jeong Eun. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 640–641, p. 1015–1023, 1 Nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>.

EPA. Status of Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) List 1 Screening Conclusions. United States Environmental Protection Agency, [s. l.], p. 1–19, 2023. Available at:

<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2023-0474-0001>. Accessed on: 7 Nov. 2023.

EU. Regulation (EC) No 1907/2006 - Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). European Agency for Safety and Health at Work, [s. l.], p. 1–574, 2006. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1907/2023-08-06>. Accessed on: 7 Nov. 2023.

FALLAHI, Alireza; REZVANI, Fariba; ASGHARNEJAD, Hashem; KHORSHIDI, Ehsan; HAJINAJAF, Nima; HIGGINS, Brendan. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 272, 1 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129878>.

FANG, Ting Yien; PRAVEENA, Sarva Mangala; DEBURBURE, Claire; ARIS, Ahmad Zaharin; ISMAIL, Sharifah Norkhadijah Syed; RASDI, Irniza. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 165, p. 358–368, 1 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.051>.

FERNÁNDEZ-ESPADA, Lucía; BENGOCHEA, Carlos; CORDOBÉS, Felipe; GUERRERO, Antonio. Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding. *Journal of Applied Polymer Science*, [s. l.], vol. 133, no. 24, 20 Jun. 2016. <https://doi.org/10.1002/app.43524>.

FILHO, Ricardo W. R.; VIEIRA, Juliana C. A. E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. [S. l.: s. n.], 2006.

FORNER-PIQUER, Isabel; BEATO, Silvia; PISCITELLI, Fabiana; SANTANGELI, Stefania; DI MARZO, Vincenzo; HABIBI, Hamid R.; MARADONNA, Francesca; CARNEVALI, Oliana. Effects of BPA on zebrafish gonads: Focus on the endocannabinoid system. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 264, 1 Sep. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114710>.

GAO, Baoyan; LIU, Jing; ZHANG, Chengwu; VAN DE WAAL, Dedmer B. Biological stoichiometry of oleaginous microalgal lipid synthesis: The role of N:P supply ratios and growth rate on microalgal elemental and biochemical composition. *Algal Research*, [s. l.], vol. 32, p. 353–361, 1 Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.019>.

GEA, Marta; TOSO, Anna; SCHILIRÒ, Tiziana. Estrogenic activity of biological samples as a biomarker. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 740, 20 Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140050>.

GERRITSEN, Jacoline; HORNUNG, Bastian; RITARI, Jarmo; PAULIN, Lars; RIJKERS, Ger T.; SCHAAP, Peter J.; DE VOS, Willem M.; SMIDT, Hauke. A comparative and functional genomics analysis of the genus *Romboutsia* provides insight into adaptation to an intestinal lifestyle. [s. l.], 17 Nov. 2019. DOI 10.1101/845511. Available at: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/845511>.

GHAED, V.; SALIMI, A.; ATTAR, R.; MIRVAKILI, A.; SALIMIAN, J. From waste to resource: Evaluating microalgae for enhanced metal adsorption in oil and gas refinery effluents.

Journal of Environmental Chemical Engineering, [s. l.], vol. 13, no. 2, 1 Apr. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.115844>.

GONÇALVES, Ana L.; PIRES, José C.M.; SIMÕES, Manuel. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, [s. l.], vol. 24, p. 403–415, 1 Jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.

GONZÁLEZ-BALDERAS, R. M.; FELIX, M.; BENGOCHEA, C.; GUERRERO, A.; ORTA LEDESMA, M. T. Influence of mold temperature on the properties of wastewater-grown microalgae-based plastics processed by injection molding. *Algal Research*, [s. l.], vol. 51, 1 Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102055>.

GONZÁLEZ-GARCINUÑO, Álvaro; TABERNERO, Antonio; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, José Ma; MARTIN DEL VALLE, Eva M.; GALÁN, Miguel A. Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea*. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 173, p. 334–341, 1 Dec. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.038>.

GONZALO IBRAHIM, Félix Gaspar; LÓPEZ-SERNA, Rebeca; MUÑOZ TORRE, Raúl; CABRERIZO PASTOR, Ana; DE GODOS CRESPO, Ignacio. Evaluating emerging pollutant removal in a scale-down high rate algae pond. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, [s. l.], vol. 13, no. 3, 1 Jun. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.116010>.

HENA, Sufia; GUTIERREZ, Leonardo; CROUÉ, Jean Philippe. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from wastewater using microalgae: A review. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 403, 5 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124041>.

HILDEBRAND, Gunda; POOJARY, Mahesha M.; O'DONNELL, Colm; LUND, Marianne N.; GARCIA-VAQUERO, Marco; TIWARI, Brijesh K. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, [s. l.], vol. 32, no. 3, p. 1709–1718, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>.

HIROOKA, Takashi; NAGASE, Hiroyasu; UCHIDA, Kotaro; HIROSHIGE, Yuji; EHARA, Yoshie; NISHIKAWA, Jun-Ichi; NISHIHARA, Tsutomu; MIYAMOTO, Kazuhisa; HIRATA, Zazumasa. Biodegradation of bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. [S. l.: s. n.], 2005.

HOEBLER, Christine; BARRY, Jean Luc; DAVID, Agnes; DELORT-LAVAL, Jean. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], vol. 37, no. 2, p. 360–367, 1 Mar. 1989. <https://doi.org/10.1021/jf00086a020>.

HOM-DIAZ, Andrea; LLORCA, Marta; RODRÍGUEZ-MOZAZ, Sara; VICENT, Teresa; BARCELÓ, Damià; BLÁNQUEZ, Paqui. Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17α -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], vol. 155, p. 106–113, 5 May 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.003>.

HORAK, Ilzé; HORN, Suranie; PIETERS, Rialet. Agrochemicals in freshwater systems and their potential as endocrine disrupting chemicals: A South African context. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 268, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115718>.

IYER, Hareesh; GRANDGEORGE, Paul; JIMENEZ, Andrew M.; CAMPBELL, Ian R.; PARKER, Mallory; HOLDEN, Michael; VENKATESH, Mathangi; NELSEN, Marissa; NGUYEN, Bichlien; ROUMELI, Eleftheria. Fabricating Strong and Stiff Bioplastics from Whole *Spirulina* Cells. *Advanced Functional Materials*, [s. l.], 2 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1002/adfm.202302067>.

JIMÉNEZ-ROSADO, M.; RUBIO-VALLE, J.F.; PEREZ-PUYANA, V.; GUERRERO, A.; ROMERO, A. Use of heat treatment for the development of protein-based bioplastics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, [s. l.], vol. 18, p. 100341, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100341>.

KASONGA, Teddy Kabeya; COETZEE, Martie A.A.; KAMIKA, Ilunga; NGOLE-JEME, Veronica M.; BENTEKE MOMBA, Maggy Ndombo. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], vol. 277, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111485>.

KASSOTIS, Christopher D.; VANDENBERG, Laura N.; DEMENEIX, Barbara A.; PORTA, Miquel; SLAMA, Remy; TRASANDE, Leonardo. Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, [s. l.], vol. 8, no. 8, p. 719–730, 1 Aug. 2020. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30128-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30128-5).

KATIBI, Kamil Kayode; YUNOS, Khairul Faezah; MAN, Hasfalina Che; ARIS, Ahmad Zaharin; BIN MOHD NOR, Mohd Zuhair; BINTI AZIS, Rabaah Syahidah. Recent advances in the rejection of endocrine-disrupting compounds from water using membrane and membrane bioreactor technologies: A review. *Polymers*, [s. l.], vol. 13, no. 3, p. 1–52, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13030392>.

KRISHNAN, A. V. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, [s. l.], vol. 132, no. 6, p. 2279–2286, 1 Jun. 1993. <https://doi.org/10.1210/en.132.6.2279>.

KRUSTOK, I.; ODLARE, M.; TRUU, J.; NEHRENHEIM, E. Inhibition of nitrification in municipal wastewater-treating photobioreactors: Effect on algal growth and nutrient uptake. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 202, p. 238–243, 1 Feb. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.020>.

LACOUTURE, Aurélie; LAFRONT, Camille; PEILLEX, Cindy; PELLETIER, Martin; AUDET-WALSH, Étienne. Impacts of endocrine-disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 204, 1 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112085>.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], vol. 68, no. 2, p. 859–864, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.859-864.2002>.

LEITE, Inacio de sá; PINTO JR, Wilson Rodrigues; SILVA, Leonardo de Araújo. Biofilme a partir de gelatina e glicerol com a adição de íons de prata como agente antimicrobiano. *Latin American Journal of Energy Research*, [s. l.], vol. 6, no. 2, p. 1–11, 29 Jan. 2020. <https://doi.org/10.21712/lajer.2019.v6.n2.p1-11>.

LI, Shengnan; CHU, Yuhao; XIE, Peng; XIE, Youping; CHANG, Haixing; HO, Shih Hsin. Insights into the microalgae-bacteria consortia treating swine wastewater: Symbiotic mechanism and resistance genes analysis. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 349, 1 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126892>.

LIER, J. Van; MAHMOUD, N.; ZEEMAN, G. Anaerobic wastewater treatment. *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design*. 2nd ed. [S. l.]: IWA Publishing, 2020. p. 701–756. https://doi.org/10.2166/9781789060362_0701.

LIU, Bo; ZHANG, Shen gen; CHANG, Chein Chi. Emerging pollutants—Part II: Treatment. *Water Environment Research*, [s. l.], vol. 91, no. 10, p. 1390–1401, 1 Oct. 2019. <https://doi.org/10.1002/wer.1233>.

LIU, Junzhuo; WU, Yonghong; WU, Chenxi; MUYLAERT, Koenraad; VYVERMAN, Wim; YU, Han Qing; MUÑOZ, Raúl; RITTMANN, Bruce. Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 241, p. 1127–1137, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.054>.

LIU, X.; WANG, Kaijun; WANG, Jingyao; ZUO, J.; PENG, Fei; WU, Jing; SAN, Erfu. Carbon dioxide fixation coupled with ammonium uptake by immobilized *Scenedesmus obliquus* and its potential for protein production. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 289, 1 Oct. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121685>.

LIU, Yu; DAI, Xiaokang; WEI, Jie. Toxicity of the xenoestrogen nonylphenol and its biodegradation by the alga *Cyclotella caspia*. *Journal of Environmental Sciences (China)*, [s. l.], vol. 25, no. 8, p. 1662–1671, 1 Aug. 2013. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60182-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60182-X).

LÓPEZ ROCHA, César Javier; ÁLVAREZ-CASTILLO, Estefanía; ESTRADA YÁÑEZ, Mirna Rosa; BENGOCHEA, Carlos; GUERRERO, Antonio; ORTA LEDESMA, María Teresa. Development of bioplastics from a microalgae consortium from wastewater. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], vol. 263, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110353>.

LÓPEZ-VELÁZQUEZ, Khirbet; RONDEROS-LARA, José G.; SALDARRIAGA-NOREÑA, Hugo A.; MURILLO-TOVAR, Mario A.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, Minerva; GUZMÁN-MAR, Jorge L.; HOIL-CANUL, Edwin R.; CABELLOS-QUIROZ, José L. Endocrine-disrupting compounds in urban rivers of the southern border of Mexico: Occurrence and ecological risk assessment. *Emerging Contaminants*, [s. l.], vol. 11, no. 1, 1 Jan. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100456>.

LOUROS, Vitória L.; LIMA, Diana L.D.; LEITÃO, Jorge H.; ESTEVES, Valdemar I.; NADAIS, Helena G.A. Impact of UASB reactors operation mode on the removal of estrone and 17 α -ethinylestradiol from wastewaters. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 764, 10 Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144291>.

LUTTERBECK, Carlos Alexandre; ZERWES, Filipe Vargas; RADTKE, Júlia Fernanda; KÖHLER, Andreas; KIST, Lourdes Teresinha; MACHADO, Ênio Leandro. Integrated system with constructed wetlands for the treatment of domestic wastewaters generated at a rural property – Evaluation of general parameters ecotoxicity and cytogenetics. *Ecological Engineering*, [s. l.], vol. 115, p. 1–8, 1 May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.01.004>.

LUTZU, Giovanni Antonio; CIURLI, Adriana; CHIPELLINI, Carolina; DI CAPRIO, Fabrizio; CONCAS, Alessandro; DUNFORD, Nurhan Turgut. Latest developments in wastewater treatment and biopolymer production by microalgae. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, [s. l.], vol. 9, no. 1, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104926>.

MA, Yingxiao; SHEN, Wendi; TANG, Tingting; LI, Zihao; DAI, Ruihua. Environmental estrogens in surface water and their interaction with microalgae: A review. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 807, 10 Feb. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150637>.

MANETTI, Marco; TOMEI, Maria Concetta. Anaerobic removal of contaminants of emerging concern in municipal wastewater: Eco-toxicological risk evaluation and strategic selection of optimal treatment. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 912, 20 Feb. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168895>.

MARTINOVIC-WEIGELT, Dalma; MINARIK, Thomas A.; CURRAN, Erin M.; MARCHUK, Jascha S.; PAZDERKA, Matt J.; SMITH, Eric A.; GOLDENSTEIN, Rachel L.; MIRESE, Christine L.; MATLON, Thomas J.; SCHULTZ, Melissa M.; SCHOENFUSS, Heiko L. Environmental estrogens in an urban aquatic ecosystem: I. Spatial and temporal occurrence of estrogenic activity in effluent-dominated systems. *Environment International*, [s. l.], vol. 61, p. 127–137, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.018>.

MATAMOROS, Víctor; GUTIÉRREZ, Raquel; FERRER, Ivet; GARCÍA, Joan; BAYONA, Josep M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 288, p. 34–42, 5 May 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.002>.

MOREIRA, Ana S.P.; GONÇALVES, Joana; SOUSA, Francisco; MAIA, Inês; PEREIRA, Hugo; SILVA, Joana; COIMBRA, Manuel A.; FERREIRA, Paula; NUNES, Cláudia. Potential of Coccolithophore Microalgae as Fillers in Starch-Based Films for Active and Sustainable Food Packaging. *Foods*, [s. l.], vol. 12, no. 3, 1 Feb. 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12030513>.

MUBARAK ALDAWSARI, Hibah; KOTTA, Sabna; ASFOUR, Hani Z.; VATTAMKANDATHIL, Sajith; ABDELKHALEK ELFAKY, Mahmoud; ASHRI, Lubna Y.; BADR-ELDIN, Shaimaa M. Development and evaluation of quercetin enriched bentonite-reinforced starch-gelatin based bioplastic with antimicrobial property. *Saudi Pharmaceutical Journal*, [s. l.], vol. 31, no. 12, p. 101861, Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101861>.

NATHANAEL, Rinaldy Jose; ADYANIS, Latonia Nur; OGINAWATI, Katharina. The last decade epidemiologic concern of drinking water contaminants of emerging concern (CECs) in Asian Countries: A scoping review. *Heliyon*, [s. l.], vol. 10, no. 20, 30 Oct. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39236>.

NG, Brian; QUINETE, Natalia; MALDONADO, Stephanie; LUGO, Kathleen; PURRINOS, Julian; BRICEÑO, Henry; GARDINALI, Piero. Understanding the occurrence and distribution of emerging pollutants and endocrine disruptors in sensitive coastal South Florida Ecosystems. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 757, 25 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143720>.

OLEA, Nicolás; PULGAR, Rosa; PÉREZ, Pilar; OLEA-SERRANO, Fátima; RIVAS, Ana; NOVILLO-FERTRELL, Arantzazu; PEDRAZA, Vicente; SOTO, Ana M.; SONNENSCHNEIN, Carlos. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, [s. l.], vol. 104, no. 3, p. 298–305, 1996. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104298>.

OLIVEIRA, Adriana Paulo de Sousa; ASSEMANY, Paula; COVELL, Lidiane; CALIJURI, Maria Lúcia. Copper multifaceted interferences during swine wastewater treatment in high-rate algal ponds: alterations on nutrient removal, biomass composition and resource recovery. *Environmental Pollution*, [s. l.], vol. 324, 1 May 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121364>.

OMOIKE, Ogbebor Enaholo; PACK, Robert P.; MAMUDU, Hadii M.; LIU, Ying; WANG, Liang. A cross-sectional study of the association between perfluorinated chemical exposure and cancers related to deregulation of estrogen receptors. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 196, 1 May 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110329>.

PARLADÉ, Eloi; HOM-DIAZ, Andrea; BLÁNQUEZ, Paqui; MARTÍNEZ-ALONSO, Maira; VICENT, Teresa; GAJU, Nuria. Effect of cultivation conditions on B-estradiol removal in laboratory and pilot-plant photobioreactors by an algal-bacterial consortium treating urban wastewater. *Water Research*, [s. l.], vol. 137, p. 86–96, 15 Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.060>.

PAUWELS, Bram; WILLE, Klaas; NOPPE, Herlinde; DE BRABANDER, Hubert; VAN DE WIELE, Tom; VERSTRAETE, Willy; BOON, Nico. 17α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17β -estradiol and estriol. *Biodegradation*, [s. l.], vol. 19, no. 5, p. 683–693, 8 Sep. 2008. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9173-z>.

PEDUTO, Thais Araujo Goya; JESUS, Tatiane Araújo de; KOHATSU, Marcio Yukihiro. Sensibilidade de diferentes sementes em ensaio de fitotoxicidade. *Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação*, [s. l.], vol. 4, no. 2, p. 200, 30 Sep. 2019. <https://doi.org/10.18554/rbcti.v4i2.3698>.

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 and Technology*, [s. l.], vol. 66, no. 12, p. 2562–2569, 2012. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.482>.

QUINTANEIRO, C.; PATRÍCIO, D.; NOVAIS, S. C.; SOARES, A. M.V.M.; MONTEIRO, M. S. Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 586, p. 390–400, 15 May 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.153>.

RAJPOOT, Aman Singh; CHOUDHARY, Tushar; CHELLADURAI, H.; NATH VERMA, Tikendra; SHENDE, Vikas. A comprehensive review on bioplastic production from microalgae. *Materials Today: Proceedings*, [s. l.], vol. 56, p. 171–178, 1 Jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.060>.

RAMOS, Márcio Daniel Nicodemos; GOMES, Tamara Maria; DE AQUINO, Sérgio Francisco; AGUIAR, André. Sewage treatment in cities of the state of Minas Gerais, Brazil, that use the UASB reactor as the only biological treatment: A case study. *Journal of Water Process Engineering*, [s. l.], vol. 56, 1 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104509>.

RAPTIS, Catherine E.; JURASKE, Ronnie; HELLWEG, Stefanie. Investigating the relationship between toxicity and organic sum-parameters in kraft mill effluents. *Water Research*, [s. l.], vol. 66, p. 180–189, 27 Aug. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.023>.

RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, [s. l.], vol. 88, no. 10, p. 3411–3424, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>.

RODRIGUES-SILVA, Fernando; MASCENO, Gabriella Paini; PANICIO, Paloma Pucholobek; IMOSKI, Rafaela; PROLA, Liziê Daniela Tentler; VIDAL, Carla Bastos; XAVIER, Claudia Regina; RAMSDORF, Wanessa Algarte; PASSIG, Fernando Hermes; LIZ, Marcus Vinicius de. Removal of micropollutants by UASB reactor and post-treatment by Fenton and photo-Fenton: Matrix effect and toxicity responses. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 212, 1 Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113396>.

ROUTLEDGE, Edwin J; SUMPTER, John P. Estrogenic Activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. [*S. l.: s. n.*], 1996.

ROY CHONG, Jun Wei; TAN, Xuefei; KHOO, Kuan Shiong; NG, Hui Suan; JONGLERTJUNYA, Woranart; YEW, Guo Yong; SHOW, Pau Loke. Microalgae-based bioplastics: Future solution towards mitigation of plastic wastes. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 206, 15 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112620>.

RUKSRITHONG, Chantima; PHATTARAPATTAMAWONG, Songkeart. Removals of estrone and 17 β -estradiol by microalgae cultivation: kinetics and removal mechanisms. *Environmental Technology (United Kingdom)*, [s. l.], vol. 40, no. 2, p. 163–170, 15 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1384068>.

SAFI, Carl; FRANCES, Christine; URSU, Alina Violeta; LAROCHE, Céline; POUZET, Cécile; VACA-GARCIA, Carlos; PONTALIER, Pierre Yves. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Research*, [s. l.], vol. 8, p. 61–68, 1 Mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.002>.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; TURNES-CAROU, I.; BESADA, V.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from

a European river basin. *Science of the Total Environment*, [s. l.], vol. 529, p. 121–130, 1 Oct. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.048>.

SANTIAGO, Aníbal Fonseca; CALIJURI, Maria Lucia; ASSEMANY, Paula Peixoto; CALIJURI, Maria do Carmo; REIS, Alberto José Delgado dos. Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent. *Environmental Technology*, [s. l.], vol. 34, no. 13–14, p. 1877–1885, Jul. 2013. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.812670>.

SHASHIREKHA, V.; SIVAKUMAR, M.; SESHADRI, S. Effective C–N–P ratio for growth and nutrient removal efficiency of *Scenedesmus obliquus* in sugar mill effluent. *Energy, Ecology and Environment*, [s. l.], vol. 1, no. 5, p. 283–295, 1 Oct. 2016. <https://doi.org/10.1007/s40974-016-0040-9>.

SHI, Wenxin; WANG, Lizheng; ROUSSEAU, Diederik P.L.; LENS, Piet N.L. Removal of estrone, 17 α -ethinylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environmental Science and Pollution Research*, [s. l.], vol. 17, no. 4, p. 824–833, May 2010. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0301-7>.

SHIN, Young Hwan; SCHIDEMAN, Lance; PLEWA, Michael J.; ZHANG, Peng; SCOTT, John; ZHANG, Yuanhui. Fate and transport of estrogenic compounds in an integrated swine manure treatment systems combining algal-bacterial bioreactor and hydrothermal processes for improved water quality. *Environmental Science and Pollution Research*, [s. l.], vol. 26, no. 16, p. 16800–16813, 1 Jun. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04969-7>.

SILVA, Priscila Romana; MOUNTEER, Ann H; BENJAMIN, Laercio dos Anjos; DE ALMEIDA, Edinael Rodrigues; VITORINO, Flavia Barros; ARCANJO, Gemima Santos; DOS SANTOS PETERSEN, Vinicius Rodrigues. Evaluation of toxicity and estrogenicity in UASB - Treated municipal sewage. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 268, Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128778>.

SUDHAKAR, Muthiyal Prabakaran; MAURYA, Rahulkumar; MEHARIYA, Sanjeet; KARTHIKEYAN, Obulisamy Parthiba; DHARANI, Gopal; ARUNKUMAR, Kulanthiyesu; PEREDA, Sandra V.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, María C.; BUSCHMANN, Alejandro H.; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Feasibility of bioplastic production using micro- and macroalgae- A review. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 240, 1 Jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117465>.

SUN, Xiao Long; WANG, Yuan; XIONG, Hao Qin; WANG, Shao Ting; FANG, Yi Chuan; XIANG, Hong. Removal of environmental estrogens from wastewater by microalgae under the influence of bacteria. *Journal of Cleaner Production*, [s. l.], vol. 414, 15 Aug. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137635>.

TENG, Miaomiao; WANG, Chen; SONG, Min; CHEN, Xiangguang; ZHANG, Jie; WANG, Chengju. Chronic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to flutolanil leads to endocrine disruption and reproductive disorders. *Environmental Research*, [s. l.], vol. 184, 1 May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109310>.

THONGPRAKAISANG, Siriporn; THIANTANAWAT, Apinya; RANGKADILOK, Nuchanart; SURIYO, Tawit; SATAYAVIVAD, Jutamaad. Glyphosate induces human breast

cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, [s. l.], vol. 59, p. 129–136, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>.

TIAN, Yajun; ZOU, Jinru; FENG, Li; ZHANG, Liqu; LIU, Yongze. *Chlorella vulgaris* enhance the photodegradation of chlortetracycline in aqueous solution via extracellular organic matters (EOMs): Role of triplet state EOMs. *Water Research*, [s. l.], vol. 149, p. 35–41, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.076>.

VALE, Francisca; SOUSA, Cátia A.; SOUSA, Henrique; SANTOS, Lúcia; SIMÕES, Manuel. Impact of parabens on microalgae bioremediation of wastewaters: A mechanistic study. *Chemical Engineering Journal*, [s. l.], vol. 442, 15 Aug. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136374>.

VASSALLE, Lucas; GARCÍA-GALÁN, María Jesús; AQUINO, Sérgio F.; AFONSO, Robson José de Cássia Franco; FERRER, Ivet; PASSOS, Fabiana; R MOTA, Cesar. Can high rate algal ponds be used as post-treatment of UASB reactors to remove micropollutants? *Chemosphere*, [s. l.], vol. 248, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125969>.

VIRUELA, Alexandre; MURGUI, Mónica; GÓMEZ-GIL, Tao; DURÁN, Freddy; ROBLES, Ángel; RUANO, María Victoria; FERRER, José; SECO, Aurora. Water resource recovery by means of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors using the effluent from an anaerobic membrane bioreactor fed with pre-treated sewage. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 218, p. 447–454, 1 Oct. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.116>.

WANG, Ping; LUAN, Jianwen; LUO, Lijuan. Removal of estrogens from primary settled sewage by repeated culture of *Selenastrum capricornutum*. *Water Science and Technology*, [s. l.], vol. 88, no. 11, p. 2837–2848, 10 Dec. 2023. <https://doi.org/10.2166/wst.2023.390>.

WANG, Ping; WONG, Yuk Shan; TAM, Nora Fung Yee. Green microalgae in removal and biotransformation of estradiol and ethinylestradiol. *Journal of Applied Phycology*, [s. l.], vol. 29, no. 1, p. 263–273, 1 Feb. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0960-y>.

WANG, Rui; LI, Feng; RUAN, Weifeng; TAI, Yiping; CAI, Hongbo; YANG, Yang. Removal and degradation pathway analysis of 17 β -estradiol from raw domestic wastewater using immobilised functional microalgae under repeated loading. *Biochemical Engineering Journal*, [s. l.], vol. 161, 15 Sep. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107700>.

WANG, Rui; WANG, Sai; TAI, Yiping; TAO, Ran; DAI, Yunv; GUO, Jingjing; YANG, Yang; DUAN, Shunshan. Biogenic manganese oxides generated by green algae *Desmodesmus* sp. WR1 to improve bisphenol A removal. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], vol. 339, p. 310–319, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.026>.

WANG, Yuwen; SUN, Qian; LI, Yan; WANG, Hongjie; WU, Kun; YU, Chang Ping. Biotransformation of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by four species of microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 180, p. 723–732, 30 Sep. 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.061>.

WANG, Zijing; YE, Wangfang; WU, Yijing; LIN, Xiaoyu; LUAN, Cuirong; XIE, Xiaowei; PENG, Yue; SUN, Xiaohong; SHI, Chuangyang; LV, Yuancai; SHEN, Jianlin; ASTATKIE, Tess; HE, Quan (Sophia); LI, Zhiyu; YANG, Jie. Protein extraction from *Chlorella pyrenoidosa*

microalgae: Green methodologies, functional assessment, and waste stream valorization for bioenergy production. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 397, 1 Apr. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130508>.

WU, Lingling; SHAO, Ying; HU, Zhangjun; GAO, Hongwen. Effects of soluble sulfide on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, [s. l.], vol. 42, p. 183–189, 1 Mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.019>.

WU, Pei Hsun; YEH, Hsin Yi; CHOU, Pei Hsin; HSIAO, Wen Wei; YU, Chang Ping. Algal extracellular organic matter mediated photocatalytic degradation of estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 209, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111818>.

XIAO, Rui; CARTER, Erika; ALLEN, Austin; TAN, Pei Lin; ZHENG, Yu Hua; CHEN, Qian; ZHU, Shun Ni; POPAT, Sudeep C.; KNOFF, Allan; WILLIAMS, Clinton F.; CHOU, Howard H.; CHEN, Huan. Nutrient recovery from high-salinity dairy wastewater through the cultivation of acclimatized microalgae. *Journal of Water Process Engineering*, [s. l.], vol. 72, 1 Apr. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107430>.

YANG, Jin Hoon; HONG, Joung Sook; LEE, Jeong Seop; SIM, Sang Jun; AHN, Kyung Hyun. Dispersion of unfractionated CO₂-derived protein-rich microalgae (*Chlorella* sp. HS2) for ecofriendly polymer composite fabrication. *Materials Today Communications*, [s. l.], vol. 31, 1 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103769>.

YE, Qing; CHENG, Jun; GUO, Wangbiao; XU, Junchen; LI, Ke; ZHOU, Junhu. Serial lantern-shaped draft tube enhanced flashing light effect for improving CO₂ fixation with microalgae in a gas-lift circumflux column photobioreactor. *Bioresource Technology*, [s. l.], vol. 255, p. 156–162, 1 May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.127>.

YILMAZ, Bayram; TEREKECI, Hakan; SANDAL, Suleyman; KELESTIMUR, Fahrettin. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, [s. l.], vol. 21, no. 1, p. 127–147, 1 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09521-z>.

YOSHIMOTO, Takeshi; NAGAI, Fumiko; FUJIMOTO, Junji; WATANABE, Koichi; MIZUKOSHI, Harumi; MAKINO, Takashi; KIMURA, Kazumasa; SAINO, Hideyuki; SAWADA, Haruji; OMURA, Hiroshi. Degradation of Estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* Isolates from Activated Sludge in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], vol. 70, no. 9, p. 5283–5289, Sep. 2004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5283-5289.2004>.

YOUNG, Brian Jonathan; RIERA, Nicolás Iván; BEILY, María Eugenia; BRES, Patricia Alina; CRESPO, Diana Cristina; RONCO, Alicia Estela. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s. l.], vol. 76, p. 182–186, Feb. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019>.

YOUNG, P.; TAYLOR, M.; FALLOWFIELD, H. J. Mini-review: high rate algal ponds, flexible systems for sustainable wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], vol. 33, no. 6, 1 Jun. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2282-x>.

YU, Chang Ping; DEEB, Rula A.; CHU, Kung Hui. Microbial degradation of steroidal estrogens. *Chemosphere*, [s. l.], vol. 91, no. 9, p. 1225–1235, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.112>.

ZAGATTO, Pedro; Bertoletti, Eduardo. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 1st ed. [S. l.: s. n.], 2006.

ZHANG, Yongli; HABTESELASSIE, Mussie Y.; RESURRECCION, Eleazer P.; MANTRIPRAGADA, Vijaya; PENG, Shanshan; BAUER, Sarah; COLOSI, Lisa M. Evaluating removal of steroid estrogens by a model alga as a possible sustainability benefit of hypothetical integrated algae cultivation and wastewater treatment systems. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, [s. l.], vol. 2, no. 11, p. 2544–2553, 3 Nov. 2014. <https://doi.org/10.1021/sc5004538>.

ZHOU, Guang Jie; YING, Guang Guo; LIU, Shan; ZHOU, Li Jun; CHEN, Zhi Feng; PENG, Fu Qiang. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, [s. l.], vol. 16, no. 8, p. 2018–2027, 2014. <https://doi.org/10.1039/c4em00094c>.

ZIELIŃSKI, Bartosz; MIADLICKI, Piotr; PRZEPIÓRSKI, Jacek. Development of activated carbon for removal of pesticides from water: case study. *Scientific Reports*, [s. l.], vol. 12, no. 1, 1 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25247-6>.

APÊNDICE

Tabela S1 – Dados coletados dos artigos selecionados na revisão bibliométrica sobre remoção de estrogênios ambientais, utilizados na construção dos gráficos apresentados neste estudo.

Authors	Microalgae	Environmental estrogen	Removal efficiency (%)	HRT (dia)	Aqueous medium	Operation mode
Bai & Acharya, 2019	Nannochloris sp.	E2	60	7	Treated and autoclaved wastewater	Batch
	Nannochloris sp.	EE2	60	7	Treated and autoclaved wastewater	Batch
	Nannochloris sp.	E1	29	7	Treated and autoclaved wastewater	Batch
	Nannochloris sp.	TCS	100	7	Treated and autoclaved wastewater	Batch
	Nannochloris sp.	BPA	46	7	Treated and autoclaved wastewater	Batch
Bano et al., 2021	Microalgae consortium	E2	91.73	13	Culture medium	Batch
	Microalgae consortium	E2	75.5	8	Culture medium	Batch
	Microalgae consortium	TCS	78.4	5	Culture medium	Batch
Cheng et al., 2018	Chlorella PY-ZU1	EE2	94	9	Culture medium	Batch
	Chlorella PY-ZU1	EE2	88	9	Culture medium	Batch
Hom-Diaz et al., 2015	Selenastrum capricornutum	E2	88	7	Wastewater digestate	Batch
	Selenastrum capricornutum	EE2	60	7	Wastewater digestate	Batch
	Chlamydomonas reinhardtii	E2	100	7	Wastewater digestate	Batch
	Chlamydomonas reinhardtii	EE2	76	7	Wastewater digestate	Batch
	Selenastrum capricornutum	E2	88	10	Culture medium	Batch
	Selenastrum capricornutum	EE2	60	10	Culture medium	Batch
	Selenastrum capricornutum	E2	100	10	Culture medium + Wastewater digestate	Batch

	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EE2	95	10	Culture medium + Wastewater digestate	Batch
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	E2	100	10	Culture medium	Batch
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	EE2	100	10	Culture medium	Batch
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	E2	100	10	Culture medium + Wastewater digestate	Batch
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	EE2	76	10	Culture medium + Wastewater digestate	Batch
Lai et al., 2002	<i>Chlorella vulgaris</i>	E2	85.2	2	Culture medium	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	E1	14.4	2	Culture medium	Batch
Liu et al., 2013	<i>Cyclotella caspia</i>	NP	37.7	8	Culture medium	Batch
	<i>Cyclotella caspia</i>	NP	31.7	8	Culture medium	Batch
	<i>Cyclotella caspia</i>	NP	6.5	8	Culture medium	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	E2	92	7	Culture medium	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	EE2	55	7	Culture medium	Batch
Wu et al., 2021	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	E2	73	7	Culture medium	Batch
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	EE2	57	7	Culture medium	Batch
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	E2	91	7	Culture medium	Batch
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EE2	83	7	Culture medium	Batch
Vale et al., 2022	<i>Chlorella vulgaris</i>	MeP	33.16	7	Synthetic wastewater	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	MeP	14.1	7	Synthetic wastewater	Batch
Wang et al., 2020	<i>Desmodesmus</i> sp. WR1	E2	85	3	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Desmodesmus</i> sp. WR1	E2	99	3	Raw wastewater filtered	Batch
Vassalle et al., 2020	Microalgae-bacteria consortium	E1	55	8	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	E2	7	8	Treated wastewater	Continuous

	Microalgae-bacteria consortium	EE2	70	8	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	E3	45	8	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	NP	70	8	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	BPA	44	8	Treated wastewater	Continuous
Wang et al., 2019	Haematococcus pluvialis	E1	97	10	Synthetic wastewater	Batch
	Haematococcus pluvialis	E2	100	10	Synthetic wastewater	Batch
	Haematococcus pluvialis	EE2	85	20	Synthetic wastewater	Batch
	Selenastrum capricornutum	E1	80	10	Synthetic wastewater	Batch
	Selenastrum capricornutum	E2	100	10	Synthetic wastewater	Batch
	Selenastrum capricornutum	EE2	26	20	Synthetic wastewater	Batch
	Scenedesmus quadricauda	E1	97	10	Synthetic wastewater	Batch
	Scenedesmus quadricauda	E2	100	10	Synthetic wastewater	Batch
	Scenedesmus quadricauda	EE2	85	20	Synthetic wastewater	Batch
	Chlorella vulgaris	E1	-9	10	Synthetic wastewater	Batch
	Chlorella vulgaris	E2	100	10	Synthetic wastewater	Batch
	Chlorella vulgaris	EE2	-18	20	Synthetic wastewater	Batch
	Shin et al., 2019	Microalgae-bacteria consortium	E1, E2, E3	89.8	4	Swine effluent
Ruksrithong et al., 2019	Scenedesmus obliquus	E1	91	5	Synthetic swine effluent	Semi-continuous
	Scenedesmus obliquus	E2	99	5	Synthetic swine effluent	Semi-continuous
	Chlorella vulgaris	E1	52	5	Synthetic swine effluent	Semi-continuous
	Chlorella vulgaris	E2	99	5	Synthetic swine effluent	Semi-continuous
Wang et al., 2017	Selenastrum capricornutum	E2	86.8	4	Culture medium	Batch

	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EE2	47.2	4	Culture medium	Batch
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	E2	71.6	7	Culture medium	Batch
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	EE2	37.5	7	Culture medium	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	E2	99.1	2	Culture medium	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	EE2	0.7	1	Culture medium	Batch
	<i>Chlamydomonas</i> sp	E2	84.9	7	Culture medium	Batch
	<i>Chlamydomonas</i> sp	EE2	70.4	7	Culture medium	Batch
Zhang et al., 2014	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	E2	95	8	Culture medium	Batch
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	17 α -E2	85	8	Culture medium	Batch
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	E1	95	8	Culture medium	Batch
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	E3	95	8	Culture medium	Batch
Zhou et al., 2014	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NP	-54	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	BPA	98.6	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	E1	84.5	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PROG	83.5	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	NP	5	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	BPA	98.9	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	E1	87.2	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	PROG	83.5	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	NP	-31	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	BPA	99,1	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	E1	87.6	7	Raw wastewater filtered	Batch

	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	PROG	84.3	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	NP	-51	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	BPA	99	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	E1	86.6	7	Raw wastewater filtered	Batch
	<i>Chlorella vulgaris</i>	PROG	86.9	7	Raw wastewater filtered	Batch
Shi et al., 2010	Microalgae consortium	E1	52	6	Synthetic wastewater	Batch
	Microalgae consortium	E2	54	6	Synthetic wastewater	Batch
	Microalgae consortium	EE2	56	6	Synthetic wastewater	Batch
Hirooka et al., 2005	<i>Chlorella fusca</i> var. <i>vacuolata</i>	BPA	90	7	Culture medium	Batch
Ye et al., 2018	<i>Chlorella</i> PY-ZU1	EE2	86		Synthetic wastewater	Batch
Parladé et al., 2018	Microalgae-bacteria consortium	E2	100	8	Raw wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	E2	100		Raw wastewater	Batch
Wang, R et al., 2017	<i>Desmodesmus</i> sp. WR1	BPA	78	7	Culture medium	Batch
Wang et al., 2023	<i>Selenastrum capricornutum</i>	E2	99.9	7	Treated wastewater	Batch
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EE2	79.1	7	Treated wastewater	Batch
Ibrahim et al., 2024	Microalgae-bacteria consortium	E1	27.3	4	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	PROG	100	4	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	MeP	68.3	4	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	EtP	-21	4	Treated wastewater	Continuous
	Microalgae-bacteria consortium	PrP	63.3	4	Treated wastewater	Continuous

Atengueño- Reyes et al., 2024	Microalgae consortium	BPA	95.68	15	Synthetic wastewater	Batch
	Microalgae consortium	TCS	86.25	15	Synthetic wastewater	Batch
	Microalgae consortium	BPA	95.1	15	Synthetic wastewater	Batch
	Microalgae consortium	TCS	61.1	15	Synthetic wastewater	Batch

Tabela S2 – Resultados da análise estatística para avaliação dos mecanismos de remoção de toxicidade do efluente do reator UASB por consórcio microalgas-bactérias.

Tratamento	Tempo				
	(h)	G	H	Z	Z > H
Luz x Escuro	24	0,08	1,20	1,07	Não
Luz x Inóculo, luz	24	0,06	1,14	0,89	Não
Luz x Inóculo, escuro	24	0,05	1,12	1,03	Não
Luz x MOE	24	0,08	1,20	1,07	Não
Escuro x Inóculo, luz	24	0,08	1,20	1,04	Não
Escuro x Inóculo, escuro	24	0,07	1,19	1,04	Não
Escuro x MOE	24	0,10	1,25	1,00	Não
Inóculo, luz x Inóculo, escuro	24	0,05	1,13	1,08	Não
Inóculo, luz x MOE	24	0,08	1,20	1,04	Não
Inóculo, escuro x MOE	24	0,07	1,19	1,04	Não
Efluente x Luz	24	0,06	1,14	1,77	Sim
Efluente x Escuro	24	0,08	1,20	1,89	Sim
Efluente x Inóculo, luz	24	0,06	1,15	1,98	Sim
Efluente x Inóculo, escuro	24	0,05	1,13	1,83	Sim
Efluente x MOE	24	0,08	1,20	1,89	Sim
Luz x Escuro	48	0,02	1,04	1,00	Não
Luz x Inóculo, luz	48	0,01	1,03	1,43	Sim
Luz x Inóculo, escuro	48	0,03	1,07	1,02	Não
Luz x MOE	48	0,04	1,09	1,01	Não
Inóculo, luz x Inóculo, escuro	48	0,03	1,06	1,45	Sim
Inóculo, luz x MOE	48	0,04	1,09	1,44	Sim
Inóculo, escuro x MOE	48	0,04	1,11	1,01	Não
Efluente x Luz	48	0,04	1,11	1,88	Sim
Efluente x Escuro	48	0,04	1,11	1,88	Sim
Efluente x Inóculo, luz	48	0,04	1,10	2,68	Sim
Efluente x Inóculo, escuro	48	0,05	1,12	1,85	Sim
Efluente x MOE	48	0,06	1,14	1,86	Sim

MOE: matéria orgânica extracelular.

Tabela S3 – Coeficientes codificados da regressão de superfície de resposta para o teor de proteína extraída em função do tempo, pH e temperatura.

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	6,5134	0,0972	66,99	0,000	
Time	0,278	0,129	2,16	0,059	1,00
pH	1,780	0,111	15,98	0,000	1,00
Temperature	0,391	0,105	3,72	0,005	1,00
Time*Time	-0,103	0,206	-0,50	0,628	1,07
pH*pH	2,287	0,155	14,78	0,000	1,06
Temperature*Temperature	-0,846	0,128	-6,59	0,000	1,02
Time*pH	-0,253	0,257	-0,98	0,352	1,12
Time*Temperature	0,160	0,272	0,59	0,571	1,12
pH*Temperature	1,067	0,234	4,55	0,001	1,11

Tabela S4 – Sumário do modelo de regressão de superfície de resposta para o teor de proteína, apresentando o erro padrão da estimativa (S) e os coeficientes de determinação (R²).

S	R²	R²(aj)	R²(pred)
0,257226	98,42%	96,85%	92,92%

Tabela S5 – Análise de Variância (ANOVA) do modelo de regressão de superfície de resposta para o teor de proteína, indicando a significância estatística dos termos do modelo.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	37,1633	4,1293	62,41	0,000
Linear	3	18,1709	6,0570	91,54	0,000
Time	1	0,3091	0,3091	4,67	0,059
pH	1	16,8893	16,8893	255,26	0,000
Temperature	1	0,9160	0,9160	13,84	0,005
Quadrado	3	18,8121	6,2707	94,77	0,000
Time*Time	1	0,0166	0,0166	0,25	0,628
pH*pH	1	14,4627	14,4627	218,59	0,000
Temperature*Temperature	1	2,8754	2,8754	43,46	0,000
Interação com 2 Fatores	3	1,4414	0,4805	7,26	0,009
Time*pH	1	0,0638	0,0638	0,96	0,352
Time*Temperature	1	0,0229	0,0229	0,35	0,571
pH*Temperature	1	1,3721	1,3721	20,74	0,001
Erro	9	0,5955	0,0662		
Falta de ajuste	3	0,1272	0,0424	0,54	0,670
Erro puro	6	0,4683	0,0780	*	*
Total	18	37,7588			

Tabela S6 – Equação de regressão quadrática múltipla para o teor de proteína extraída em unidades reais (não codificadas)

Protein
Protein = 6,26 - 1,311 pH + 0,0774 Temperature + 0,09148 pH*pH - 0,000940 Temperature*Temperature + 0,00711 pH*Temperature