



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Cultivo da Microalga *Scenedesmus* sp. em presença de Nonilfenol Etoxilado

Autor: Ana Luísa A. S. C. de Araujo

Orientador: Prof. Dra. Mariliz Gutterres

Co-Orientador: Me. Juliana Tolfo

Porto Alegre, julho de 15

Sumário

Sumário	III
Agradecimentos	V
Resumo	VI
Lista de Figuras	VII
Lista de Tabelas	IX
Lista de Símbolos	X
Lista de Abreviaturas e Siglas	XI
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 As microalgas e suas aplicações	3
2.1.1 Microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	5
2.2 Disruptores Endócrinos	6
2.2.1 Definição	6
2.2.2 Hormônios e mecanismos de ação dos DE	6
2.2.3 Ocorrência e remoção	7
2.3 Nonilfenol Etoxilado	9
2.4 Remoção de Disruptores Endócrinos com Microalgas	14
3 Materiais e Métodos	16
3.1 Inóculo	16
3.2 Materiais	16
3.3 Condições de cultivo	17
3.4 Análise do crescimento das microalgas	18
3.4.1 Densidade óptica	19
3.4.2 Peso seco	19
3.5 Análise da Remoção do NP ₉₅ EO através de Espectroscopia UV-Vis	19
4 Resultados e Discussão	20
4.1 Crescimento das microalgas	20
4.1.1 Registro Fotográfico	22
4.2 Remoção de NPnEO	24
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	29
6 Referências	31
7 ANEXOS	39
7.1 Anexo 1 - Resultados dos experimentos 5 e 6	40
7.2 Anexo 2: Curvas de Abs x Concentração dos experimentos	42
7.3 Anexo 3 - Concentração de NPnEO durante todo o tempo experimental	44

Agradecimentos

Primeiramente, à Grande Mãe e ao Grande Pai Universal, com suas sincronias. Por ter me iluminado em toda esta jornada. Pelo seu plano divino!

Aos meus pais, Ana Maria e Leonardo, por me darem uma base sólida, por me oportunizarem estes estudos. Também por todo apoio, incentivo, carinho e amor de sempre.

Ao meu amado marido, Camilo, por reascender em mim o gosto pelos estudos, estar sempre ao meu lado e me dar força para seguir adiante em todos os momentos que precisei. Por toda sua prestatividade e tolerância. Sem você não conseguiria.

À minha querida irmã Aline, por seu grande companheirismo, confiança, auxílio, risadas, carinho e amor de sempre.

Aos meus filhos, Arthur Francisco e Gabriel Somnath, por ter me mostrado a real importância da vida, me incentivar a seguir em frente e me dar força e alegria em todos os momentos.

À minha querida orientadora e professora Mariliz, pela excelente orientação, pela grande disponibilidade, pela atenção, auxílio e por todo carinho.

À minha co-orientadora, Ju, pela excelente orientação, por tudo que me ensinou, pela dedicação, pelo auxílio incondicional, pela compreensão e pela amizade.

À toda equipe do Lacouro, por toda prestatividade e atenção.

Aos meus amigos e ex-colegas de faculdade, Alice, Cauã e Carlo. Por toda a ajuda, bons momentos e noites divertidas de estudos que fizeram deste tempo inesquecível.

Enfim, a todos que me oportunizaram chegar até aqui.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo a remoção do produto comercial nonilfenol etoxilado a 9,5 mols de óxido de etileno, NP₉₅EO – substância precursora de compostos disruptores endócrinos altamente refratários -, através da microalga *Scenedesmus* sp., bem como analisar o crescimento das mesmas na presença do poluente. Foram realizados 6 experimentos em escala laboratorial, nos quais as microalgas foram expostas a diferentes concentrações de NP₉₅EO. O crescimento das microalgas e a remoção de nonilfenol etoxilado foi acompanhado por análises em espectrofotômetro UV-Vis nos comprimentos de onda característicos. A microalga *Scenedesmus* sp. mostrou ser resistente ao nonilfenol etoxilado e o crescimento das culturas foi contínuo ao longo dos experimentos. Porém, aparentemente não se mostrou eficiente na remoção de NP₉₅EO, visto seu baixo percentual de remoção no presente estudo relativo a sua periculosidade em mínimas concentrações no meio ambiente. Os experimentos 1, 2, 3 e 4, de concentrações iniciais de NP₉₅EO de 10.000 mg/L, 1.000 mg/L, 100 mg/L e 50 mg/L, apresentaram remoção de 45,68%, 67,85%, 23,85% e 22,44%, respectivamente; os experimentos 5 e 6 (1 mg/L e 0,5 mg/L de concentrações iniciais de NP₉₅EO) apresentaram um aumento na concentração do composto. As baixas remoções e o aumento da concentração de nonilfenol etoxilado nos meios de cultivo podem estar associados à formação dos compostos derivados do NP₉₅EO que são absorvidos no mesmo comprimento de onda. Sugere-se a análise dos compostos por outros métodos que possam identificar as substâncias presentes, como por exemplo, HPLC ou GC-MS, visto que outros estudos obtiveram resultados promissores.

Palavras-chaves: microalgas, *Scenedesmus* sp., nonilfenol etoxilado, nonilfenol, disruptores endócrinos.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Esquema de um processo de multipropósito da utilização de microalgas.....	5
Figura 2.2: <i>Scenedesmus brasilienses</i>	5
Figura 2.3: Esquema do mecanismo de ação dos DE em células orgânicas.....	7
Figura 2.4: Distribuição da produção relativa de diversos setores de NPEO em 1994 na União Europeia.....	11
Figura 2.5: Rota de degradação dos APEO.....	12
Figura 3.1: Materiais utilizados para a preparação dos experimentos, durante sua exposição à radiação UV na cabine de segurança microbiológica.....	17
Figura 3.2: Incubadora provida de agitação, controle de temperatura e lâmpadas frias acopladas.....	18
Figura 4.1: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 1 (concentração inicial de NP ₉₅ EO de 10.000 mg/L).....	20
Figura 4.2: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 2 (concentração inicial de NP ₉₅ EO de 1.000 mg/L).....	21
Figura 4.3: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 3 (concentração inicial de NP ₉₅ EO de 100 mg/L).....	21
Figura 4.4: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 4 (concentração inicial de NP ₉₅ EO de 50 mg/L).....	21
Figura 4.5: Curva do crescimento percentual relativo das culturas dos experimentos 1, 2, 3 e 4.....	22
Figura 4.6: Experimentos 1 e 2, triplicatas e abiótico (da esquerda à direita) – dia 0 (após a inoculação).....	23
Figura 4.7: Experimentos 1 e 2, triplicatas e abiótico (da esquerda à direita) –18ºdia.....	23
Figura 4.8: Experimentos 1 (à esquerda) e 2 (à direita) no 34º dia.....	23
Figura 4.9: Experimentos 1 (à esquerda) e 2 (à direita) no 41º dia.....	23
Figura 4.10: Experimentos 3 e 4, triplicatas e abiótico (da esquerda à direita) – dia 0 (após a inoculação).....	23
Figura 4.11: Experimento 3 (à esquerda) e 4 (à direita) – 18º dia.....	24
Figura 4.12: Experimento 3 (à esquerda) e 4 (à direita) – 28º dia.....	24
Figura 4.13: Espectro de absorção do NP ₉₅ EO.....	24
Figura 4.14: Curva de calibração do NP ₉₅ EO, equação da reta e R-quadrado.....	25
Figura 4.15: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 1 (Ci = 10.000 mg/L) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração... 26	26
Figura 4.16: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 1 (Ci = 1.000 mg/L) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração..... 26	26
Figura 4.17: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 3 (Ci = 100 mg/L) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração..... 26	26

VIII

Figura 4.18: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 4 ($C_i = 50 \text{ mg/L}$) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração.....	27
Figura A.1: Curva de crescimento das microalgas nos experimentos 5 e 6.....	40
Figura A.2: Alteração da concentração de NP95EO com o tempo do experimento 5.....	40
Figura A.3: Alteração da concentração de NP95EO com o tempo do experimento 6.....	41
Figura A.4: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 1. ...	42
Figura A.5: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 2. ...	42
Figura A.6: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 3. ...	42
Figura A.7: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 4. ...	43
Figura A.8: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 5. ...	43
Figura A.9: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 6. ...	43
Figura A.10: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 1.	44
Figura A.11: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 2.	44
Figura A.12: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 3.	45
Figura A.13: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 4.	45

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Exemplos de DE e algumas de suas respectivas ocorrências.	8
Tabela 2.2: Remoção de alguns DE em um tratamento convencional de efluentes urbanos e suas concentrações em cada etapa do tratamento.	9
Tabela 2.3: Propriedades físico-químicas do NP95EO.	10
Tabela 2.4: Concentrações de NP, NP ₁ EO, NP ₂ EO, NPnEO e NPnEC em diversas matrizes ambientais.	13
Tabela 2.5: Remoção de disruptores endócrinos através de culturas de microalgas.....	15
Tabela 3.1: Composição do meio Guillard Modificado.	16
Tabela 3.2: Experimentos realizados e suas respectivas concentrações de NP ₉₅ EO.	18
Tabela 4.1: Remoção total média de NPnEO dos experimentos e seus respectivos tempo de duração.	27

Lista de Símbolos

C _i	Concentração inicial de NPnEO da amostra em mg/L
C _t	Concentração no tempo 't' de NPnEO da amostra em mg/L
OD570	Densidade Ótica a 570 nm
P ₁	Massa do filtro em g
P ₂	Massa do filtro seco com microalgas em g
V	Volume de amostra filtrada em L

Lista de Abreviaturas e Siglas

APEO	Alquilfenol Etoxilado
ATP	Adenosina Trifosfato
BPA	Bisfenol A
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCP	Diclorofenóis
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DE	Disruptor Endócrino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E2	β -estradiol
EE2	17- α -etinilestradiol
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada de Espectrômetro de Massas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IPCS	<i>International Programm on Chemical Safety</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada em um Espectrômetro de Massas
NP	Nonilfenol
NPEC	Nonilfenol Ácido Acético Etoxilado
NPEO	Nonilfenol Etoxilado
NPnEC	Nonilfenol Ácido Acético Etoxilado com n unidades de grupos de óxido de etileno
NPnEO	Nonilfenol Etoxilado com n unidades de grupos de óxido de etileno
PCB	Bifenilas Policloradas
PS	Poliestireno
PVC	Policloreto de Polivinila
UV	Ultravioleta
v.v.m.	Volume de vapor por volume líquido por minuto

“Se hoje os estragos são imensos e os mortos se contam às centenas, não tardará o dia em que os flagelados e os mortos totalizarão milhões. Somos incapazes de aprender com nossos erros. As advertências sempre mais dramáticas da Natureza de nada valem. Insistimos no consumo de nosso futuro. O homem moderno desmonta e degrada sistematicamente a Ecosfera, isto é, a grande unidade funcional do Caudal da Vida. Não somente estraga, uma a uma, as peças da engrenagem, mas ainda joga areia no mecanismo, dificultando seu funcionamento e preparando o colapso. Está claro que a espécie humana não poderá continuar por muito tempo com a sua cegueira ambiental e com sua falta de escrúpulos na exploração da Natureza. Tudo tem seu preço, e, quanto maior o abuso, maior será o preço. Devemos compreender que a Ecosfera é uma unidade funcional onde todas as peças são complementares de todas as demais.”

José A. Lutzenberger (retirado do livro “Do Jardim ao Poder”)

“Primeiro precisamos mudar os paradigmas. Primeiro precisamos conhecer o funcionamento da Natureza. Se nos inspirarmos na Natureza, se imitarmos seus métodos inteligentes e elegantes, se nos aliarmos a ela – em vez de combatê-la sempre -, encontraremos o caminho para um convívio rico e saudável. Para um convívio sustentável.”

José A. Lutzenberger (retirado do livro “Crítica ecológica do pensamento econômico”)

1 Introdução

A problemática da poluição das águas é emergente, haja vista o aumento populacional e da produção de insumos e de bens de consumo, tornando de grande proporção os impactos associados. As microalgas têm sido estudadas como uma alternativa economicamente viável e sustentável aos tratamentos convencionais das águas residuais, ou como uma etapa adicional aos mesmos. Elas são capazes de remover elementos como C, N, P, metais pesados, removem patógenos, realizam a biorremediação de águas, e a biomassa gerada pode ser posteriormente aproveitada para outros fins, como em biocombustíveis (Lourenço, 2006). O presente estudo tem como objetivo analisar o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. na presença do produto comercial nonilfenol etoxilado a 9,5 mols de óxido de etileno – substância precursora de compostos disruptores endócrinos altamente refratários -, bem como verificar a remoção do poluente em culturas de microalgas.

Microalgas são seres algais unicelulares que realizam fotossíntese, constituindo o maior e mais distribuído grupo de organismos fotossintéticos nos ecossistemas aquáticos; são responsáveis por 60% da produção de O₂ no Planeta e são mais eficientes na fixação de CO₂ que as plantas terrestres (Chisti, 2004). Elas utilizam o carbono como principal fonte nutricional para seu crescimento, o qual pode ser proveniente de substâncias orgânicas ou inorgânicas, do meio aquoso ou da atmosfera. Consomem também outros elementos, como N, P e inclusive metais pesados, possuindo capacidade de remover também patogênicos da água. Recentemente, as microalgas têm recebido muita atenção no meio científico devido ao seu efetivo papel de retirar poluentes das águas bem como por sua habilidade de produzir biomassa, podendo ser utilizada em diferentes aplicações industriais, como na produção de biocombustível, biogás, alimentos, fármacos, fertilizante, ração animal e biossurfactantes (Lourenço, 2006 ; Correa-Reyes *et al.*, 2007 ; Guieysse *et al.*, 2008 ; Pellón *et al.*, 2011 ; Matamoros *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, constatou-se que alguns compostos têm capacidade de provocar efeitos no sistema endócrino, denominados disruptores endócrinos (DE) - também chamados desreguladores, interferentes ou perturbadores endócrinos. Esses poluentes têm recebido maior atenção devido aos seus efeitos deletérios na saúde de animais, incluindo seres humanos, em concentrações mínimas (na ordem de ng/L) e pela persistência de parte destas substâncias no meio ambiente. Os disruptores endócrinos atuam diretamente em todas as células que possuem atividade endócrina, mimetizando, bloqueando ou estimulando a ação de hormônios. Essa atuação resulta uma resposta do organismo que, por ser anormal ao sistema orgânico, gera inúmeras disfunções, como diabetes, cânceres, infertilidade, déficit de atenção, entre outras (Colburn e Thayer, 2000 ; Bergman *et al.*, 2012 ; Esteban *et al.*, 2014) .

O nonilfenol etoxilado (NPnEO, n=1-100), precursor de disruptores endócrinos, é um produto largamente utilizado comercial e industrialmente, como em segmentos têxteis, curtumes, lavanderias, assim como na formulação de alguns plásticos, detergentes, agrotóxicos, resinas, tintas e outros (Sun *et al.*, 2012). Sua molécula possui uma parte hidrofílica – os grupos de óxido de etileno - e outra hidrofóbica e altamente lipofílica – nonilfenol (NP). Na sua degradação, vai perdendo os grupos de óxido de etileno, resultando em compostos de menores unidades de etoxilação, que são altamente persistentes e com potencial de disrupção endócrina, como o NPnEO com n=1-2 e o NP.

Cerca de 60-65% dos compostos de nonilfenol que entram em estações de tratamento de esgoto são descartados no meio ambiente. Como consequência do uso, descarte, degradação dos NPEO e da ineficiência do tratamento das águas, estudos mostram a onipresença de NP no meio ambiente (Ying *et al.*, 2002 ; Jardim e Ghiselli, 2007 ; Silva *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Aquino *et al.*, 2013 ; ECHA, 2013).

Urge o desenvolvimento de tecnologias para a remoção de disruptores endócrinos devido às descargas diárias nos corpos hídricos e sua dificuldade de remoção. Na última década, alguns estudos vêm demonstrando a possibilidade da utilização das microalgas na remoção de tais poluentes, podendo ser uma alternativa de baixo custo e baixos impactos ambientais relacionados. Com a intensa busca por novas fontes de combustíveis, a biomassa de microalgas cultivadas em estações de tratamento de água pode ser uma alternativa rentável e sustentável para produção de biocombustíveis, conferindo às microalgas multipropósitos de significativa importância à sociedade contemporânea (Cho *et al.*, 2013 ; Abdulsada, 2014 ; Kiran *et al.*, 2014).

No presente trabalho foram realizados 6 experimentos em triplicata, na escala laboratorial, onde a microalga *Scenedesmus* sp. foi exposta a diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado a 9,5 mols de óxido de etileno (NP₉₅EO ou NPnEO com n=9.5), juntamente com seu meio de cultivo (Guillard modificado). Para cada experimento, foi feito um meio abiótico de controle, com as mesmas características, porém sem a presença das microalgas para analisar a degradação do NP₉₅EO em um meio sem os micro-organismos. Amostras foram tomadas durante vários dias e com elas feitas medidas de peso seco e densidade ótica em um espectrofotômetro, a fim de verificar o crescimento das culturas de microalgas e sua resistência ao DE. Para avaliar a remoção de NP₉₅EO nos experimentos, o comprimento de onda característico das amostras foi medido em um espectrofotômetro UV-visível.

2 Revisão Bibliográfica

Nesta revisão serão percorridos os assuntos para a compreensão do trabalho. Primeiro, serão abordadas as microalgas e algumas de suas aplicações, focando na sua capacidade de tratamento das águas. Depois, será apresentada uma revisão acerca dos disruptores endócrinos, como eles funcionam e onde são encontrados. Por último, uma abordagem sobre o nonilfenol etoxilado, suas aplicações e ocorrência.

2.1 As microalgas e suas aplicações

Algas são seres muito diversificados presentes em sistemas aquáticos (ou zonas úmidas), grande parte delas são dotadas de clorofila e são capazes de realizar fotossíntese. Suas espécies apresentam distinção quanto à origem, composição química e morfologia, envolvendo seres unicelulares e multicelulares, microscópicos (microalgas) e macroscópicos (macroalgas). Podem ser heterotróficas, fotoautotrófica ou possuem a capacidade de crescer em condições mixotróficas (fotoautotróficas e heterotróficas), ou seja, quando expostas a uma luz, utilizam CO₂ como fonte de carbono, quando no escuro, utilizam o carbono orgânico ou inorgânico dissolvido (Lourenço, 2006). Sob a denominação microalgas estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica, com representantes nas divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*; estrutura celular eucariótica, com representantes nas divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Xantophyceae*, etc.), *Cryptophyta* e *Dinophyta* (Derner *et al.*, 2006).

Devido a sua substancial biomassa e sua extensiva gama de habitat e diversidade, as microalgas constituem o maior e mais distribuído grupo de organismos fotossintéticos nos ecossistemas aquáticos. Como produtores primários, têm um importante papel por gerar substâncias orgânicas primárias e ser a base da cadeia alimentar aquática, constituindo o fitoplâncton de um dado local. Calcula-se que pelo menos 90% da produção primária marinha global seja derivada do fitoplâncton (Lourenço, 2006 ; Zhou *et al.*, 2013). As microalgas são responsáveis por 60% da produção de O₂ no Planeta e são mais eficientes na fixação de CO₂ que as plantas terrestres (Chisti, 2004).

O carbono é um dos principais elementos para o crescimento e acumulação de metabólitos das microalgas, seguido por nitrogênio e fósforo. Elas fixam de forma eficiente o carbono de diferentes fontes, como o carbono da atmosfera, de exaustão de gases industriais e na forma de carbonatos solúveis ou químicos orgânicos. Para realizar a síntese proteica, lipídica e de adenosina trifosfato (ATP) utilizam nitrogênio e fósforo presentes no meio (Zeng *et al.*, 2015). Ainda, consomem outros elementos como S, K, Mg, Si, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Na, entre outros, diferenciando para cada espécie. Possuem capacidade de remover nutrientes, metais pesados e patogênicos da água, o que tem sido estudado desde 1950. Elas são também um meio de bioconcentração e biomagnificação significativa de poluentes no meio aquático (Lourenço, 2006 ; Correa-Reyes *et al.*, 2007 ; Guieysse *et al.*, 2008 ; Pellón *et al.*, 2011 ; Matamoros *et al.*, 2015)

Recentemente, as microalgas têm recebido muita atenção no meio científico devido ao seu efetivo papel de retirar poluentes das águas, bem como por sua habilidade de produzir biomassa, podendo ser utilizada em diferentes aplicações industriais como na

produção de biocombustível, biogás, alimentos, fármacos, fertilizante, ração animal e biossurfactantes (Derner *et al.*, 2006 ; Chisti, 2007 ; Abdel-Raouf *et al.*, 2012 ; Schimitz *et al.*, 2012 ; Cho *et al.*, 2013 ; Ramirez, 2013 ; Abdulsada, 2014 ; Kiran *et al.*, 2014 ; Torres, 2014 ; Blázquez, 2015 ; Matamoros *et al.*, 2015). Como dependem nutricionalmente de substâncias orgânicas e inorgânicas, as microalgas têm o potencial para o tratamento de efluentes, podendo realizar biorremediação nas águas. Além disso, por sua capacidade de retirar e acumular grandes quantidades de íons metálicos da água, há a possibilidade de recuperação de elementos de alto valor agregado como ouro e prata (Pellón *et al.*, 2011 ; Zeng *et al.*, 2015). Assim, as microalgas podem ser uma solução plausível para o tratamento das águas, além de ser economicamente viável e ambientalmente segura (Lika e Papadakis, 2009 ; Park *et al.*, 2011 ; Kiran *et al.*, 2014).

A incorporação das microalgas no tratamento convencional de esgoto pode melhorar o desempenho do tratamento. Estudos mostram que as microalgas podem alcançar reduções importantes de DBO, DQO, amônia, nutrientes como N e P e bactérias. (Martínez *et al.*, 2000 ; Abdel-Raouf *et al.*, 2012 ; He *et al.*, 2012 ; Cabanelas *et al.*, 2013 ; Torres, 2014). A biomassa gerada possui alto valor energético e pode ser usada para aumentar a produção de biogás em digestores anaeróbios. Além disso, as microalgas podem gerar oxigênio e reduzir a energia necessária para a aeração e, portanto, o custo global do tratamento (Cho *et al.*, 2013 ; Abdulsada, 2014).

Com uma disponibilidade insuficiente de combustíveis fósseis, há uma necessidade urgente de procurar novas fontes de energia renováveis mais econômicas. Apesar de oleaginosas terrestres terem boas perspectivas na substituição de fontes convencionais, outras razões associadas, tais como a segurança alimentar e baixo rendimento de óleo por hectare, são responsáveis pela diminuição do interesse em plantas terrestres para a produção de biocombustíveis (Kiran *et al.*, 2014). Esgotos sanitários urbanos contêm em média 50 g/m³ de nitrogênio, sendo que cada m³ pode contribuir para a formação de 0,5 kg de biomassa para extração de biocombustível (Torres, 2014). Assim, a biomassa de microalgas é uma opção atraente devido ao seu elevado teor de óleo em comparação com culturas terrestres. Além disso, a transformação de biomassa de algas para sintetizar biocombustível utiliza menos produtos químicos e emite menos CO₂ (Matamoros *et al.*, 2015).

Na atual economia, os combustíveis produzidos a partir de microalgas são mais caros do que os produzidos de óleo a partir de petróleo fóssil convencional. Uma abordagem potencial para ultrapassar os condicionalismos econômicos é fornecer nutrientes para o crescimento de microalgas das águas residuais e gases de combustão, assim gerando biomassa para produção de biocombustíveis e extração de bioquímicos de alto valor agregado, tais como proteínas, hidratos de carbono, ácidos graxos, vitaminas e pigmentos. Resíduos da biomassa algal poderiam ainda ser utilizados como alimentos para animais e peixes, e também como adubo, como mostrado na Figura 2.1. Foi demonstrado que esta abordagem é mais rentável do que a geração de produtos de fluxo único e gera menos impactos ambientais em termos de carbono, espaço físico, custos capitais, energia e consumo de nutrientes. Porém, ainda é necessário um desenvolvimento tecnológico para a otimização do sistema, como por exemplo: o processo de cultivo, a desidratação da biomassa, a extração e a conversão para biocombustíveis, o transporte e a purificação de proteínas, entre outros (Chisti, 2007 ; Zeng *et al.*, 2015).

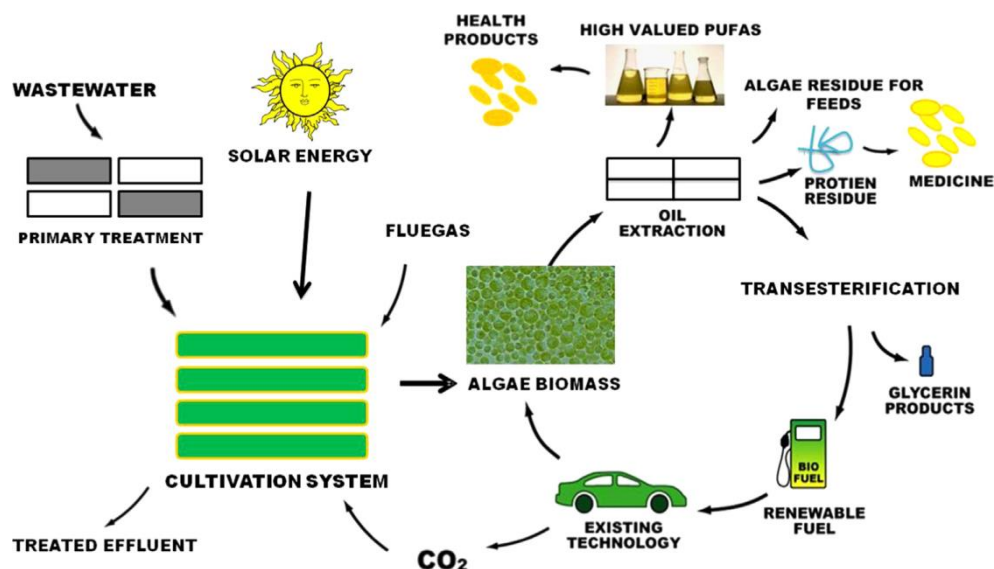


Figura 2.1: Esquema de um processo de multipropósito da utilização de microalgas
Fonte: (Zeng et al, 2015).

2.1.1 Microalga *Scenedesmus* sp.

O gênero *Scenedesmus* pertence à classe *Chlorophyceae*, ordem *Sphaeropleales*, família *Scenedesmaceae*. Existem 74 espécies incluídas, como: *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus brasilienses*, *Scenedesmus acuminatus*, entre outras. É um dos gêneros de microalgas mais encontrado em águas doces, geralmente formando colônias de 4, 8 ou 16 células (Lürling, 1999a ; Rodrigues, 2008). Estudos em fósseis datam a *Scenedesmus* de 70 a 100 milhões de anos atrás (Hegewald, 1997)

A *Scenedesmus* e várias outras clorófitas, como a *Chlorella* e a *Tetraselmis*, apresentam crescimento rápido e alta tolerância às condições de cultivo. Características que explicam por que são utilizadas em tratamento de efluentes, na alimentação de animais, na produção de biocombustível, fertilizantes, biohidrogênio, entre outros (Lourenço, 2006 ; Miranda, 2011 ; Abdel-Raouf *et al.*, 2012 ; Marques, 2013 ; Batista *et al.*, 2014).

Possuem mecanismos de defesa, um deles é a formação de colônias, reduzindo a relação volume/superfície, o que limita a retirada de nutrientes e sua iluminação, diminuindo sua taxa de crescimento. Outros mecanismos de defesa são paredes celulares grossas e mucilagem, o que possibilita a resistência na digestão de tóxicos (Lürling, 1999b ; Lürling e Donk, 2000). Estudos recentes relatam a remoção de disruptores endócrinos com a espécie *Scenedesmus* podendo ser assim uma alternativa na remoção destes poluentes das águas (Pellón *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Peng *et al.*, 2014).

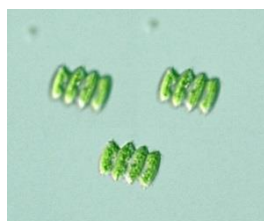


Figura 2.2: *Scenedesmus brasilienses*.
Fonte: (JST, 2015).

2.2 Disruptores Endócrinos

Disruptores endócrinos (DE) são substâncias orgânicas e inorgânicas, de origem natural ou sintética, capazes de alterar as funções endócrinas de organismos de animais. Presentes em larga escala no uso industrial e em produtos de uso doméstico, concentrações na ordem de ng/L são capazes de surtir efeitos nocivos à saúde de animais, incluindo seres humanos, ocasionando assim diversas disfunções. Oriundos de agrotóxicos, fármacos, produtos de higiene pessoal, químicos industriais, produtos de limpeza, metais, hormônios naturais dos animais, plásticos e outros, difundem-se nas águas em uma velocidade tal qual o crescimento industrial e populacional, atingindo também os solos e a atmosfera (Bila e Dezotti, 2007 ; Bergman *et al.*, 2012). Esses compostos onipresentes nas águas superficiais ainda não recebem nenhuma regulamentação e, conseqüentemente, não são analisados e tratados. No entanto, nos últimos anos é crescente o número de estudos que contém relatos de suas presenças, efeitos nocivos e interação com o meio ambiente (Esteban *et al.*, 2014).

2.2.1 Definição

O termo “disruptores endócrinos” deriva do inglês “endocrine disruptors”, utilizado pela primeira vez pela zoóloga Theo Colburn em 1991 para denominar agentes ou substâncias químicas presentes no meio ambiente, capazes de se acumular no solo e nos sedimentos dos rios, contaminarem a cadeia alimentar e promoverem alterações hormonais (Fontenele *et al.*, 2009). A tradução para o português tem apresentado divergências no meio científico, variando entre disruptores endócrinos, perturbadores endócrinos, desreguladores endócrinos, interferentes endócrinos e outros (Bila e Dezotti, 2007). No presente trabalho optou-se por utilizar o termo “disruptores endócrinos” por se assemelhar ao termo em inglês.

Ainda não se tem um consenso sobre uma definição técnica dos disruptores endócrinos. A primeira definição data de 1996, proposta durante a Conferência de Weybrigde, no Reino Unido (Jardim e Ghiselli, 2007). Em 2002, o *International Programm on Chemical Safety* – IPCS da União Europeia sugeriu uma definição amplamente utilizada que traz a definição: “uma substância ou mistura exógena que altera a(s) função(ões) do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos na saúde de um organismo intacto, ou seu progenitor ou (sub) populações.” (Jardim e Ghiselli, 2007 ; Bergman *et al.*, 2012).

2.2.2 Hormônios e mecanismos de ação dos DE

Hormônios são moléculas produzidas pelas glândulas endócrinas que viajam através do sangue com o fim de produzirem efeitos em células e tecidos. Algumas glândulas como a pituitária, a tireoide, as de adrenalina, as gônadas e certas partes do pâncreas, são especializadas na produção hormonal. Além dessas, outros órgãos - que são parte de sistemas orgânicos como o coração, músculos, intestinos, fígado, gordura corporal e rins - possuem funções secundárias secretoras de hormônios. Assim, hormônios são essenciais para controlar a maioria dos processos no corpo, desde processos de formação, como a diferenciação celular e formação dos órgãos durante o desenvolvimento embrionário, até o controle de tecidos e órgãos em adultos. Ou seja, os hormônios controlam o funcionamento não apenas do sistema reprodutor, mas da saúde como um todo, coordenando as ações de órgãos e tecidos, para que trabalhem afinados. (Colburn e Thayer, 2000 ; Bergman *et al.*, 2012).

Os hormônios produzem efeitos ligando-se a proteínas especializadas, as quais são chamadas receptores hormonais. O complexo resultante age no DNA do núcleo da célula, gerando uma resposta do organismo (Figura 2.3). Os receptores hormonais possuem uma alta afinidade com seu respectivo hormônio, assim concentrações hormonais muito baixas são capazes de gerar uma resposta biológica natural. Os disruptores endócrinos são concebidos pelo corpo humano como um hormônio; ligam-se aos receptores hormonais podendo agir de maneira a mimetizar ou bloquear a ação de hormônios. Outros efeitos também podem ocorrer, como alterações na síntese e remoção de hormônios e de seus receptores, além de interações com sistemas multi-hormonais simultaneamente (Jardim e Ghiselli, 2007 ; Fontenele *et al.*, 2009 ; Bergman *et al.*, 2012).

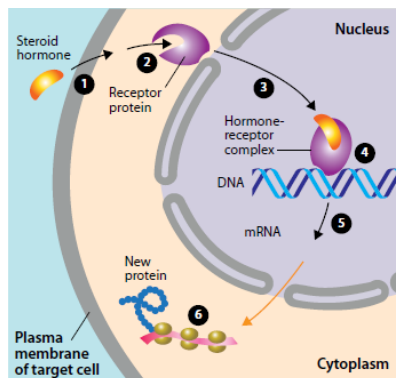


Figura 2.3: Esquema do mecanismo de ação dos DE em células orgânicas.

Fonte: (Bergman *et al.*, 2012)

Os sistemas fisiológicos afetados pelos DE incluem todos os sistemas hormonais primários e secundários, abrangendo o desenvolvimento e as funções dos órgãos reprodutores. Muitas doenças têm sido relacionadas à exposição aos DE, como diabetes, obesidade, doenças do coração, câncer de testículo, próstata, ovário e mama. Fetos e recém-nascidos têm demonstrado ser altamente vulneráveis à ação deste tipo de agente químico (Casals-Casas e Desvergne, 2010 ; Peres, 2011 ; Bergman *et al.*, 2012). Cabe salientar que estamos constantemente expostos a uma mistura de variados DE, sendo essa mistura capaz de resultar uma toxicidade maior que os estudos demonstram, pois estes analisam geralmente a interação de apenas um ou dois DE em organismos (Crane *et al.*, 2006 ; Bergman *et al.*, 2013).

2.2.3 Ocorrência e remoção

Em 2000, a União Européia listou 533 substâncias com capacidade de desregular o sistema endócrino, porém não existe uma lista definitiva, carecem estudos acerca de muitos compostos em circulação no mercado e das novas substâncias que surgem com o avanço tecnológico (Bila e Dezotti, 2007 ; Jardim e Ghiselli, 2007 ; Fernandes, 2012). Os DE podem ser classificados em dois grandes grupos: as substâncias sintéticas, incluindo hormônios sintéticos e xenoestrogênios (substâncias de origem exógena com estrutura não esteróide, porém de ação similar aos estrogênios endógenos); e as substâncias naturais, hormônios de animais e fitoestrogênios, presentes por exemplo na soja ou naturalmente nos organismos vivos (Figueiredo 2014). Os DE naturais não se acumulam no organismo, são excretados de forma natural, diferentemente dos sintéticos, os quais possuem compostos altamente lipofílicos, que acumulam-se nos tecidos adiposos (Colburn e Thayer, 2000). A Tabela 2.1 apresenta alguns exemplos de DE e algumas utilizações.

Tabela 2.1: Exemplos de DE e algumas de suas respectivas ocorrências.

Substâncias	Exemplos	Exemplos de ocorrência
Organoclorados	PCBs, Dioxinas	Óleos hidráulicos, plastificantes, subprodutos de combustões incompletas.
Ftalatos	Cloro ftalato	Aditivos para flexibilidade em plásticos, produtos de cuidado pessoal.
Alquilfenóis	Nonilfenol etoxilado	Detergentes, aditivos para combustíveis e lubrificantes, adesivos.
Bisfenol	Bisfenol A	Plásticos e resinas.
Fármacos	17 α etinilestradiol	Pílula anticoncepcional.
Parabenos	Benzilpareno, etilparabeno	Produtos de cuidado pessoal.
Pesticidas	DDT, Atrazina, Glifosato	Herbicidas, fungicidas, inseticidas.
Metais pesados	Pb, Hg, Cd	Baterias, lâmpadas, tabaco.
Fitoen strogênios	Genisteína, metaresinol	Soja, feijões.
Estrogênios Naturais	17 β -estradiol, estrona e estriol	Seres humanos e outros seres vivos.

Os DE entram no meio ambiente através da produção, utilização e eliminação - disposição final, incineração ou reciclagem - de produtos que os contenham, os quais estão presentes em grande escala nas atividades industriais. As emissões atingem as águas, os solos e a atmosfera. A maior emissão ocorre quando DE são incorporados a materiais e produtos, tais como plásticos, tapetes, roupas e equipamentos elétricos. Produtos de cuidado pessoal como shampoo, desodorantes, sabonetes, pastas de dente, filtros solares entre outros, são outra fonte de DE que diariamente são lançados nas águas, eles possuem, em sua maioria, parabenos, triclosan e aquilfenóis. Existe uma carência de estudos sobre a identificação, concentrações ambientais, toxicidade e potencial de bioacumulação destes poluentes (Brausch e Rand, 2011 ; Bergman *et al.*, 2012). Devido a sua grande diversidade e uso, os DE são onipresentes em diversas matrizes ambientais, sendo a ocorrência de disruptores endócrinos sintéticos no meio ambiente um excelente marcador do impacto do homem no meio ambiente e um bom indicador da qualidade das águas (Raimundo, 2007 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Esteban *et al.*, 2014 ; Priac *et al.*, 2014).

Uma importante fonte de entrada dos DE no meio ambiente é a atividade agrícola intensiva, com o uso de agrotóxicos, através do escoamento de campos, do transporte atmosférico das substâncias por longas distâncias - proveniente principalmente da pulverização aérea - e, por fim, do consumo e descarte dos alimentos produzidos. Um estudo de simulação computacional realizado com dois pesticidas, mirex e clordecona - sendo o primeiro utilizado também como retardante de chama em plásticos, equipamentos eletrônicos, borrachas e papéis -, mostra que uma vez contaminada uma área, ela permanece por muitos anos contaminada. Ainda, aponta que mesmo que esses pesticidas fossem banidos hoje, em 500 anos ainda encontrariam-se traços, principalmente na superfície do solo (Pinto *et al.*, 2007).

A maioria dos DE são mais polares que os poluentes em geral, e muitos tem grupos funcionais ácidos ou básicos. Essas propriedades, juntamente com a ocorrência em níveis traço (i.e., < 1µg/L), criam um desafio para sua detecção analítica e remoção (Eddy *et al.*, 2007). Apesar da eficiência das ETEs, há necessidade de procedimentos adicionais na etapa final do processo para que ocorra a eliminação de DE. Dados da literatura sobre a eficiência da remoção de estrogênios em ETEs reforçam a necessidade de tratamentos adicionais a serem aplicados no efluente tratado, já que mínimas concentrações afetam organismos (Lopes, 2008 ; Ferreira, 2012). Na Tabela 2.2 são apresentadas algumas eficiências de remoção de três importantes DE – bisfenol A, nonilfenol e o pesticida 2,4-D.

Tabela 2.2: Remoção de alguns DE em um tratamento convencional de efluentes urbanos e suas concentrações em cada etapa do tratamento.
Adaptado de (Zoh 2014).

Compostos	Concentrações médias em ng/L				
	Afluente	Efluente da coagulação - sedimentação	Efluente da filtração em filtros de areia	Efluente da desinfecção com cloro	Remoção (%)
Bisfenol A	88 ± 102.8	17.5 ± 8.6	21.4 ± 12.9	19 ± 8.7	78.4
Nonilfenol	41.5 ± 52.1	35 ± 75.54	11.4 ± 5.12	12.6 ± 5.9	70
Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)	33.6 ± 25.1	15.6 ± 14	6.6 ± 1.8	6.5 ± 15	81

2.3 Nonilfenol Etoxilado

O nonilfenol etoxilado (NPnEO, n=1-100) é um surfactante não iônico pertencente à classe dos alquilfenóis etoxilados (APEO) mais utilizada internacionalmente, representando cerca de 80% dos APEO produzidos (Sun *et al.*, 2012 ; Priac *et al.*, 2014). É sintetizado a partir da adição, em meio básico, de óxido de etileno a nonilfenol (NP), formando uma molécula com uma parte hidrofílica (grupos de óxido de etileno) e uma parte lipofílica e hidrofóbica (nonilfenol), caracterizando um surfactante não iônico. O NP é um produto de origem intermediária do ciclo de refinamento do petróleo, é geralmente formado pela alquilação do fenol com uma mistura de isômeros de nonano em presença de catalisador ácido, gerando vários isômeros de NP, predominantemente para-substituídos como o 4-nonilfenol ou orto-substituídos como o 2-nonilfenol (Ying *et al.*,

2002 ; Jardim e Ghiselli, 2007 ; Silva *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 2013). O NPEO apresenta um padrão de biodegradação complexo, caracterizado pela formação de produtos biorefratários e disruptores endócrinos (Giger *et al.*, 1984 ; Ahel *et al.*, 1987). No presente trabalho optou-se utilizar o produto comercial NP₉₅EO com n=9,5, por sua larga faixa de utilização. A Tabela 2.3 mostra algumas propriedades físico-químicas do composto.

Tabela 2.3: Propriedades físico-químicas do NP₉₅EO.

Fonte: Boletim técnico do NP₉₅EO fornecido pela Quimicamar Indústria e Comércio de Produtos Químicos e

http://www.oxiteno.com.br/cms/media/24872/ultranex_hc_port.pdf, acesso em: 25/03/2015

Propriedade	Descrição
Aspecto	Sólido ou líquido
Formula molecular	C ₁₅ H ₂₄ O
Peso molecular	617,6 g/mol
pH	5,0 a 7,5 (sol.aq. a 1% p/p, 25°C)
Pressão de vapor	< 0,001 kPa (20°C)
Ponto de fusão	<5°C
Densidade	1060 kg/m ³ (25°C)
Viscosidade	230 a 270 mPa.s (25°C)

O NPEO é amplamente utilizado na indústria e em produtos domésticos, sobretudo por sua capacidade emulsionante, dispersante, umectante, espumante, detergente, estabilizante e de diminuir a tensão superficial. Apresenta, pois, ampla utilização, dentre as quais: agente umectante e estabilizante em adesivos/selantes, pesticidas e agroquímicos em geral, desengraxante e limpeza de peles em curtumes, detergentes industriais e residenciais, dispersante em polímeros e pigmentos, emulsificante de gorduras, ceras, querosene, óleo mineral, silicões e resina acrílica, emulsionante em indústrias têxteis, agente antioxidante, emulsionante e estabilizador em plásticos de policloreto de polivinila (PVC) e poliestireno (PS), espermicida em espumas contraceptivas, cosméticos e outros produtos de cuidado pessoal, auxiliares na indústria do papel, auxiliares na indústria de materiais de construção, solubilizante na indústria farmacêutica, auxiliares na indústria metalúrgica, dispersante em tintas gráficas, produtos extintores de incêndio, inibidores de poeira e polidores comerciais de prataria (Galembeck, 1996 ; Henriques, 2008). O gráfico da Figura 2.4 mostra a produção relativa de NPEO em 1994, na União Europeia.

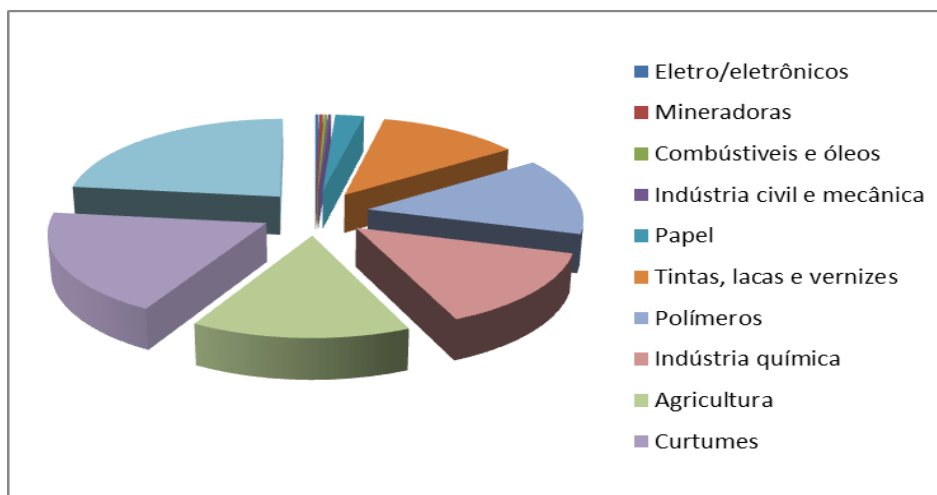


Figura 2.4: Distribuição da produção relativa de diversos setores de NPEO em 1994 na União Europeia.

Fonte: (ECHA, 2013).

Depois de seu descarte, diretamente no meio ambiente, em uma estação de tratamento ou nos lodos dos tratamentos, são convertidos a compostos mais tóxicos e refratários, sendo estes nonilfenol, nonilfenol mono e dietoxilados (NP₁EO e NP₂EO), e nonilfenol ácido acético etoxilados (NP₁EC e NP₂EC), todos apresentando atividade desreguladora do sistema endócrino (ECHA, 2013). Estes compostos são altamente lipofílicos, podendo assim biomagnificarem e bioacumularem-se em organismos (Giger *et al.*, 1984 ; Ahel *et al.*, 1994b ; Correa-Reyes *et al.*, 2007 ; Jardim e Ghiselli, 2007 ; Zhou *et al.*, 2013). Um estudo feito por Vazquez-Duhalt com a microalga *Isochrysis galbana*, mostrou que as microalgas expostas ao NP são capazes de bioconcentrarem significativamente o poluente, e peixes e crustáceos com elas alimentados tiveram seu crescimento comprometido, demonstrando a capacidade de biomagnificação deste composto (Correa-Reyes *et al.*, 2007).

A biodegradação do NP₉₅EO no meio aquático ocorre da mesma maneira que para todos os APEO, Figura 2.5. Os produtos comerciais de nonilfenol etoxilado são normalmente uma mistura de diferentes comprimentos da cadeia de óxido de etileno, variando 'n' de 1 a 12 em uma distribuição de Poisson, sendo, no presente caso, o NP₉₅EO (n=9,5) a maior concentração (Sun *et al.*, 2012). Primeiramente a molécula vai perdendo os grupos de óxido de etileno (EO), resultando em nonilfenol etoxilados de menores unidades, geralmente 1 ou 2, altamente persistentes no meio ambiente e disruptores endócrinos. A taxa de remoção da cadeia etoxilada aumenta com o aumento do comprimento da cadeia. Em condições aeróbicas, NP_nEO de cadeia curta (n<4) são também oxidados a ácidos acéticos correspondentes, nonilfenol ácido acético etoxilado (NP_nEC), porém a uma taxa de reação mais baixa. Então, NP₁EC e NP₁EO são convertidos em nonilfenol, altamente refratário e desregulador endócrino (Acosta *et al.*, 2004-2005); esta reação é muito demorada em meio aeróbio, em meio anaeróbico, o NP é mais rapidamente formado. Por fim, a degradação total é estabelecida com a quebra do anel benzênico da molécula de NP (Ying *et al.*, 2002). A temperatura é uma variável importante na biodegradação dos NP_nEO, estudos mostram que a biotransformação destes compostos aumenta de 2 a 10 vezes com uma mudança na temperatura de 13°C para 23°C (Ahel *et al.*, 1994b).

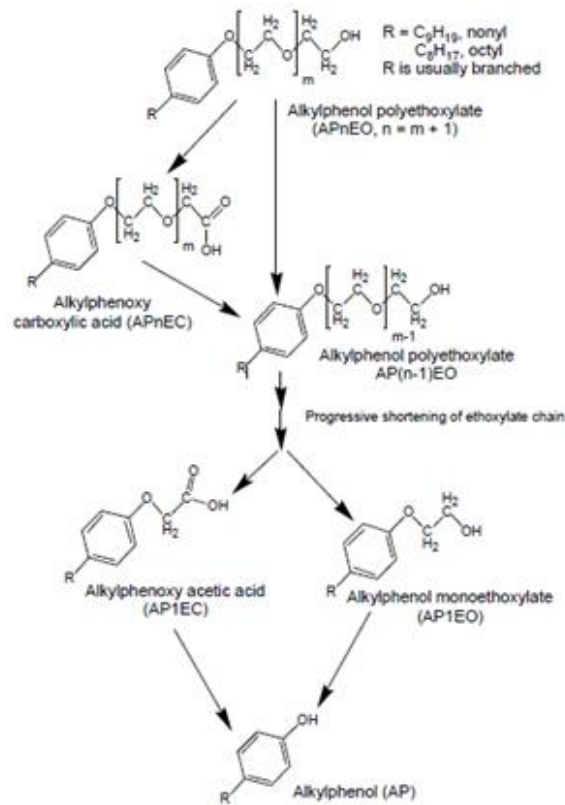


Figura 2.5: Rota de degradação dos APEO.
Fonte (Ying *et al.*, 2002).

Os NPnEOs (n=1-2) e o NP não são completamente degradados em estações de tratamento, cerca de 60-65% dos compostos de nonilfenol que entram em estações de tratamento de esgotos são descartados no meio ambiente, destes, 25% são na forma de NP e 11% na forma de NP1EO e NP2EO (Aquino *et al.*, 2013 ; ECHA, 2013). Análises de fluxo mássico em duas plantas de tratamento revelaram que a concentração de NP aumentou em 181-758% em relação ao efluente de entrada, isso devido a degradação do NPnEO a NP, sendo a maioria absorvido nas lamas de tratamento (Ahel *et al.*, 1994a). Na Tabela 2.2 da seção 2.2, percebe-se que NP é gerado na etapa de coagulação-sedimentação e grande parte deste é removido através de um filtro de areia, devido a absorção no lodo gerado nesta etapa.

Como consequência do seu uso, descarte, biodegradação dos NPEOs e da ineficiência do tratamento das águas, estudos mostram a onipresença de NP no meio ambiente (Cai *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Priac *et al.*, 2014). Na última década, NP e seus etoxilados têm sido frequentemente detectados em rios, lagos, oceanos, águas subterrâneas, sedimentos e solos (Ying *et al.*, 2002 ; Guieysse *et al.*, 2008 ; Cai *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Esteban *et al.*, 2014 ; Milinovic *et al.*, 2015). Embora nos últimos anos o uso destes compostos na formulação de detergentes de uso doméstico tenha sido diminuído em alguns países da Europa, eles ainda continuam sendo empregados em muitas outras aplicações industriais (Jardim e Ghiselli, 2007). Estudos demonstraram uma onipresença de NP nos alimentos, podendo ser explicada por diversas vias como: o emprego de NP nos agentes de limpeza, nos pesticidas, nas indústrias alimentícias e na agricultura, bem como em embalagens de alimentos (Silva *et al.*, 2007 ; Cai *et al.*, 2012). A Tabela 2.4 mostra concentrações de NP e seus derivados em algumas matrizes ambientais.

Tabela 2.4: Concentrações de NP, NP₁EO, NP₂EO, NPnEO e NPnEC em diversas matrizes ambientais.

Adaptado de (Martin e Voulvoulis, 2014).

Fonte	NP	NP ₁ EO	NP ₂ EO	NPnEO	NPnEC	Referências
Esgoto doméstico (µg/L)	<0,02-0,9	0,43-2,7	1,13-2,17	0,005-12,2	0,15-5,6	(Guieysse <i>et al.</i> , 2008 ; Giger <i>et al.</i> , 2009)
Solo (mg/kg)	nd-1.6	nd	nd	-	-	(Barcelos <i>et al.</i> , 2007 ; Gómez-Rico <i>et al.</i> , 2008 ; Guieysse <i>et al.</i> , 2008)
Lamas de ETA (µg/l)	0,1-2530	385	2,9	2,1-135	nd-14	(Guieysse <i>et al.</i> , 2008)
Lamas industriais (µg/L)	2,5 x 10 ⁶	-	-	1,4x10 ⁶	-	(Barcelo e Petrovic, 2000 ; Jonkers <i>et al.</i> , 2000 ; Jonsson <i>et al.</i> , 2001 ; Ying <i>et al.</i> , 2002 ; Jurgens e Johnson, 2003 ; Gatidou <i>et al.</i> , 2007 ; Gómez-Rico <i>et al.</i> , 2008 ; Guieysse <i>et al.</i> , 2008)
Ar (µg/dm ³)	0,01-81	-	-	-	-	(Ying <i>et al.</i> , 2002)
Águas superficiais (µg/L)	nd-644	nd-76	nd-76	nd-41	nd-70	(Blackburn <i>et al.</i> , 1999 ; Barcelo e Petrovic, 2001 ; Bolz <i>et al.</i> , 2001 ; Furlong <i>et al.</i> , 2002 ; Jurgens e Johnson, 2003 ; Takada e Isobe, 2004 ; Braunbeck <i>et al.</i> , 2005 ; Vethaak, 2005 ; Torrents <i>et al.</i> , 2007 ; Guieysse <i>et al.</i> , 2008 ; Giger <i>et al.</i> , 2009)
Lençol freático (µg/L)	nd-12 x 10 ⁵	nd-7	nd-10	-	-	(Barcelo e Petrovic, 2001 ; Inoue <i>et al.</i> , 2005 ; Ding <i>et al.</i> , 2006 ; Guieysse <i>et al.</i> , 2008)
Mar (µg/L)	nd-4,1	-	-	nd-3,3	nd	(Barcelo e Petrovic, 2001 ; Inoue <i>et al.</i> , 2005 ; Ding <i>et al.</i> , 2006)
Sedimentos marítimos (µg/L)	nd-1080	-	-	nd-2200	nd-92	(Jonkers <i>et al.</i> , 2000 ; Metcalfe e Bennett, 2000 ; Barcelo e Petrovic, 2001 ; Guieysse <i>et al.</i> , 2008)
Algas	nd-1600	60-7000	nd-3100	-	-	(Giger <i>et al.</i> , 1993)
Mexilhões	10-800	nd-170	nd-160	-	-	(Blackburn <i>et al.</i> , 1999 ; Metcalfe e Bennett, 2000)
Peixes	10-160	190-940	-	-	-	(Jones <i>et al.</i> , 1999)
Alimentos	0,1-19,4	-	-	-	-	(Ying <i>et al.</i> , 2002 ; Reinhard e Montgomery-Brown, 2003 ; Vethaak, 2005 ; Telfer <i>et al.</i> , 2007 ; Cai <i>et al.</i> , 2012)
Leite de ovelha	30-1000	-	-	-	-	(Reinhard e Montgomery-Brown, 2003 ; Telfer <i>et al.</i> , 2007)
Ingestão diária (µg)	160	-	-	-	-	(Schlatter <i>et al.</i> , 1998)
Urina de crianças e jovens (3-24 anos) (µg/L)	17,4	-	-	-	-	(Li <i>et al.</i> , 2013)

nd – não detectado

Vários estudos estão associando a exposição ao NP a diversas anomalias na saúde humana e de animais, sendo crescente a preocupação de potenciais riscos para a função reprodutiva (Tsutsumi, 2005 ; Olovsson *et al.*, 2009 ; Bergman *et al.*, 2012). A capacidade de desregulação endócrina deste composto é três vezes superior à do pesticida DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) (Henriques, 2008). Concentrações já foram detectadas na urina, no sangue e no leite materno de seres humanos (Calafat *et al.*, 2008a ; Calafat *et al.*, 2008b ; Funari *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2013). É urgente estudos e ações a serem tomadas tendo em vista a constante exposição de seres humanos ao NP através de várias rotas, como ar, solo, sedimentos, água, alimentos, absorção pela pele através de produtos de cuidado pessoal e produtos que contenham o DE (Raecker *et al.*, 2002 ; Torrents *et al.*, 2007 ; Benotti *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2013) e seus potenciais efeitos na saúde.

2.4 Remoção de Disruptores Endócrinos com Microalgas

É emergente o desenvolvimento de tecnologias para a remoção de disruptores endócrinos (DE) devido às suas descargas diárias nos corpos hídricos e sua dificuldade de remoção (Blánquez, 2015). O carbono, presente em abundância nos DE, é a principal necessidade nutricional das microalgas (representa cerca de 50% de sua composição). Assim, as microalgas podem ser uma alternativa de baixo custo e impactos ambientais relacionados para a remoção destes compostos (Matamoros *et al.*, 2015). Existem poucos estudos sobre a remoção de DE com o uso de microalgas, mas seus resultados são promissores, ainda mais levando em consideração a posterior utilização da biomassa em biocombustíveis e outros produtos de valor agregado, como já mencionados na seção 2.1.

Na Tabela 2.5 são apresentados estudos da remoção de disruptores endócrinos com diferentes espécies de microalgas. As microalgas podem remover estes compostos por processos de sorção ou degradação. Estudos mostram que a degradação é o mecanismo de remoção mais relevante dos poluentes pelas microalgas, sendo maior que a capacidade dos processos de sorção, que somente são ativados por compostos hidrofóbicos e valores moderados da constante de Henry como as fragrâncias (Abargues *et al.*, 2013 ; Peng *et al.*, 2014 ; Blánquez, 2015 ; Matamoros *et al.*, 2015).

Um estudo feito por Kotzabasis e Papazi (2013) sobre a biodegradação de diclorofenóis com a microalga *Scenedesmus obliquus*, apresenta a possibilidade das microalgas operarem como “máquinas” bioenergéticas inteligentes, com a habilidade de constantemente “calcular” a reserva de energia e “utilizar” a estratégia de biodegradação mais vantajosa para o caso dos diclorofenóis (DCP). Por exemplo, a partir de um determinado grau de toxicidade dos DCP, as microalgas aumentaram a energia oferecida para a biodegradação e diminuíram a energia para produção de biomassa. Este estudo mostrou que as microalgas aplicaram diferentes estratégias bioenergéticas para otimizar a administração do balanço entre a toxicidade dos DCP, sua biodegradação e o crescimento algal, demonstrando sua habilidade para a remoção de substâncias tóxicas (Papazi e Kotzabasis, 2013).

Tabela 2.5: Remoção de disruptores endócrinos através de culturas de microalgas.

Espécies	DE	Remoção (%)	Bibliografia
<i>Clorella</i> sp.	Nonilfenol	80	(Gao <i>et al.</i> , 2011a)
<i>Chlamydomonas mexicana</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	Bisfenol A (BPA)	34	(Ki <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clorella vulgaris</i>	Nonilfenol	>98	(Gao <i>et al.</i> , 2011b)
<i>Monoraphidium braunii</i>	Bisfenol A	48	(Gattullo <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cyclotella cáspia</i>	Nonilfenol	37,7	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Cromo	92,4	(Pellón <i>et al.</i> , 2011)
<i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Progeste-rona	95	(Peng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Nonilfenol e Octilfenol	≈100	(Zhou <i>et al.</i> , 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	β-estradiol (E2) e 17-α-etinilestradiol (EE2)	76 e 100	(Blánquez, 2015)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	E2 e EE2	88 e 100	(Blánquez, 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Anabaena cylindrica</i> e <i>Microcystis aeruginosa kutz</i>	E2 e EE2	18-20 e 16-37	(Ge <i>et al.</i> , 2008)
<i>Chlorella vulgaris</i>	NP e NPnEO	82.1 e 95.7	(Sun <i>et al.</i> , 2012)

3 Materiais e Métodos

Nesta seção serão descritos os materiais utilizados nos procedimentos realizados para a inoculação das microalgas, no preparo das soluções e nas análises amostrais. Também serão descritas as condições de cultivo de cada experimento.

3.1 Inóculo

A microalga *Scenedesmus* sp., utilizada neste estudo, foi cedida pelo Grupo de Integração, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP/LACIP) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para a manutenção das microalgas utilizaram-se cultivos que foram repicados na fase exponencial de crescimento, os quais foram utilizados como inóculos. O meio de cultura utilizado para a preparação dos inóculos e dos experimentos foi o meio Guillard Modificado conforme (Ramirez, 2013). Os inóculos foram mantidos numa incubadora com temperatura controlada, a 25°C, alimentação de ar filtrado com vazão de 750 ml/min e controlador de fotoperíodo de 12h/12h e 3910 lux.

Os reagentes utilizados na composição padrão do meio Guillard Modificado estão apresentados na Tabela 3.1. Para o preparo do meio de cultivo foi sempre utilizada água destilada autoclavada.

Tabela 3.1: Composição do meio Guillard Modificado.

Fonte: (Ramirez, 2013).

Macronutrientes	Concentração (g.L ⁻¹)	Micronutrientes	Concentração (g.L ⁻¹)
CaCl ₂ *H ₂ O	36,76	Na ₂ EDTA	4,36
MgSO ₄ *7H ₂ O	36,97	FeCl ₃ *6H ₂ O	3,15
NaHCO ₃	12,60	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,01
K ₂ HPO ₄	8,71	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,022
NaNO ₃	85,01	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,01
Na ₂ SiO ₃ *9H ₂ O	28,42	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,18
		Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,006

3.2 Materiais

Os materiais utilizados no experimento consistiram basicamente de *erlenmeyers*, béqueres, pipetas reguláveis, ponteiros, tubos *falcons* para armazenamento, “batoques”¹, entre outros. Todas as vidrarias e materiais utilizados na preparação do inóculo, preparação e manutenção dos experimentos, bem como a água destilada e as soluções estoques do meio de cultivo utilizadas foram esterilizadas. O processo de esterilização foi

¹ Espécie de tampas para os *erlemeyers* feitas de buchas de algodão envoltas de ataduras.

realizado em uma autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos. Para a preparação das soluções experimentais, vidrarias esterilizadas e soluções do meio de cultivo foram expostas a radiação UV por 15 minutos em uma cabine de segurança microbiológica (marca Pachane, modelo Pa 410) devidamente esterilizada (Figura 3.1). As soluções que compõem o meio de cultivo foram armazenadas em refrigerador a 8°C.



Figura 3.1: Materiais utilizados para a preparação dos experimentos, durante sua exposição à radiação UV na cabine de segurança microbiológica.

3.3 Condições de cultivo

Os cultivos de microalgas foram realizados em escala laboratorial, em frascos *erlenmeyers* com capacidade de 250 mL, com um volume total utilizado de 200 mL. O meio de cultura utilizado na preparação dos experimentos foi o meio Guillard Modificado, conforme já mencionado na Seção 3.1. Uma alíquota de 20 mL de solução de meio de cultivo e microalgas (cultura em fase exponencial de crescimento), padronizados a uma densidade óptica a 570 nm (OD₅₇₀) de 0,1 de absorbância foram inoculados em cada experimento.

Para a verificação do crescimento da cultura e do uso potencial da microalga *Scenedesmus* sp. para a remoção do poluente, utilizaram-se diferentes concentrações do NP₉₅EO, apresentadas na Tabela 3.2. As concentrações variaram de valores elevados (10.000 e 1.000 mg/L), com o objetivo do estudo do crescimento das microalgas até a valores mais comumente encontrados em efluentes industriais (100 e 50 mg/L) e valores relativamente baixos (1 e 0,5 mg/L). Valores na ordem de grandeza da ocorrência usual em matrizes ambientais (ng/L ou µg/L) não foram utilizados devido a possibilidade de não detecção do método de análise. O produto comercial nonilfenol etoxilado a 9.5 mols foi adquirido na Quimicamar Indústria e Comércio de Produtos Químicos.

Tabela 3.2: Experimentos realizados e suas respectivas concentrações de NP₉₅EO.

Experimento	Concentração de NP ₉₅ EO (mg/L)
1	10000
2	1000
3	100
4	50
5	1
6	0,5

Todos os experimentos de cultivo foram realizados em triplicata com o fim de diminuir possíveis causas de erro. Cada triplicata foi acompanhada de um experimento controle em um frasco com meio abiótico (nas mesmas condições, porém sem microalgas) a fim de verificar a degradação do NP₉₅EO sem a presença das microalgas.

Os frascos de cultivos foram alocados em uma incubadora refrigerada com agitação, marca Marconi modelo MA832, Figura 3.2. A fim de manter a incubadora iluminada, foram adaptadas lâmpadas de *led* em seu interior (iluminação fornecida de aproximadamente 10000 lux). As culturas permaneceram em fotoperíodo de 12 horas iluminadas e 12 horas no escuro. A agitação foi mantida a 150 rpm para garantir a aeração das culturas. A temperatura foi mantida a 25°C, valor adequado para o crescimento das microalgas.



Figura 3.2: Incubadora provida de agitação, controle de temperatura e lâmpadas frias acopladas.

3.4 Análise do crescimento das microalgas

Sendo o NP₉₅EO e seus derivados tóxicos para organismos, para analisar a interferência da substância no crescimento das microalgas, foram utilizados os métodos de análise de densidade ótica e peso seco.

3.4.1 Densidade óptica

Medidas de absorvância no comprimento de onda de 570 nm foram feitas para encontrar a concentração das microalgas, que é determinada de acordo com a Lei de Beer-Lambert que diz que a absorvância é diretamente proporcional à concentração de espécies absorventes presentes. Assim, um gráfico relacionando a absorvância e a concentração de microalgas resulta em uma reta, que com a equação pode-se encontrar os valores do peso seco através das absorvâncias lidas. O comprimento de onda escolhido – 570 nm - leva em consideração que a obstrução física é a única influência na medida, estando distante dos comprimentos de onda absorvidos pelas microalgas e pelo NPEO (Lourenço, 2006 ; Wang *et al.*, 2011 ; Ramirez, 2013). Para as leituras de absorvância, alíquotas de 4 mL tomadas de cada experimento foram coletadas em tempos determinados e as medidas foram realizadas em um espectrofotômetro marca PG Instruments modelo T80+ UV/Vis. Amostras que apresentavam valores de absorvância maiores que 1 foram diluídas.

3.4.2 Peso seco

A concentração de microalgas em mg/L nos cultivos foi determinada com base na metodologia de sólidos totais, adaptada do Standart Methods (2005) Uma alíquota de 10 ml de cada cultivo foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo em filtros de fibra de vidro com tamanho nominal de poros 0,7 µm, previamente pesados em uma balança analítica. Os filtros foram secos em estufa por 24 h a temperatura de 100 °C. Depois de secos e de estarem na temperatura ambiente, foram novamente pesados. A determinação do peso seco em g/L foi obtida através da diferença entre a massa inicial e final dos filtros, dividida pelo volume de amostra filtrada conforme a equação 3.1.

$$\text{Peso seco} = \frac{P_2 - P_1}{V} \quad (3.1)$$

Onde:

Peso seco = concentração de microalgas (g/L)

P1 = Massa do filtro (g)

P2 = Massa do filtro seco com microalgas (g)

V = Volume de amostra filtrada (L)

3.5 Análise da Remoção do NP₉₅EO através de Espectroscopia UV-Vis

A remoção do NP₉₅EO foi analisada através de medições de absorvância em um espectrofotômetro da marca PG Instruments, modelo T80+ UV/Vis, utilizando uma cubeta de quartzo de 4 mL. O método de detecção foi escolhido por ter se mostrado eficiente em estudos anteriores (Kim *et al.*, 2005 ; Bonenfant *et al.*, 2009 ; Silva, 2013) e por ser um método que não requer nenhum preparo amostral.

4 Resultados e Discussão

Nesta seção serão apresentados os resultados bem como uma discussão acerca deles. Primeiramente será abordado o crescimento das microalgas, analisado através de medidas de peso seco e absorbância. Estes resultados demonstram a possibilidade do crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em presença de nonilfenol etoxilado. Em segundo momento, serão apresentados os resultados da concentração do NP₉₅EO nas culturas de microalgas durante os experimentos, onde poderá ser observado que as microalgas conseguiram remover parte do poluente.

Optou-se por não apresentar os resultados dos experimentos de menor concentração - 5 e 6 -, pois estes, aparentemente, não alcançaram resultados desejáveis, mostrando um aumento de NPnEO a partir do 3º e 4º dia de experimento. Os resultados encontram-se no Anexo 1 deste trabalho. Os valores encontrados podem ser justificados pela inadequação do método de análise devido às baixas concentrações, à interferência do meio de cultivo na análise e/ou à formação dos derivados do nonilfenol etoxilado (nonilfenol ácido acético etoxilado e nonilfenol).

4.1 Crescimento das microalgas

Durante o tempo de realização dos experimentos observou-se o crescimento algal, demonstrando ser possível seu cultivo na presença do NP₉₅EO. Assim, as espécies de microalgas em questão apresentaram ser resistentes ao DE, inclusive em concentrações muito elevadas como no experimento 1 e 2 (10.000 mg/L e 1.000 mg/L de NP₉₅EO respectivamente). Os gráficos realizados para obtenção de alguns valores da concentração de microalgas, conforme explicado na Seção 3.4.1, se encontram no Anexo 2 deste trabalho. As Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4 apresentam a concentração de microalgas, em g/L ao longo do tempo experimental em dias. Nas culturas dos experimentos 1 e 2, ocorreu a morte das microalgas, a partir do 22º dia para o experimento 1 e do 34º dia para o 2. No último dia destes experimentos (41º), as microalgas encontravam-se mortas, isto possivelmente deve-se ao consumo do meio de cultivo e a consequente falta dos nutrientes necessários para seu crescimento, como por exemplo, nitrogênio e fósforo. O pH das culturas também foi medido, todas apresentaram um valor de pH inicial de 6,5 e o final de aproximadamente 10.

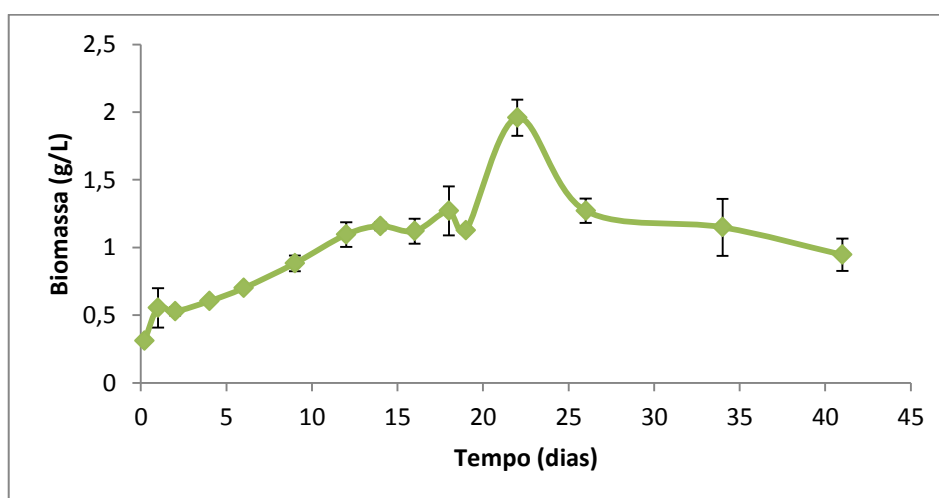


Figura 4.1: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 1 (concentração inicial de NP₉₅EO de 10.000 mg/L).

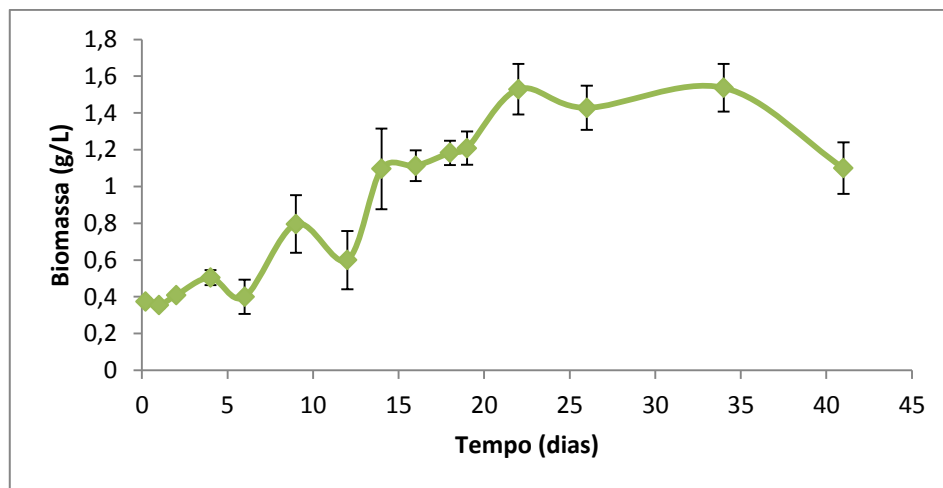


Figura 4.2: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 2 (concentração inicial de NP₉₅EO de 1.000 mg/L).

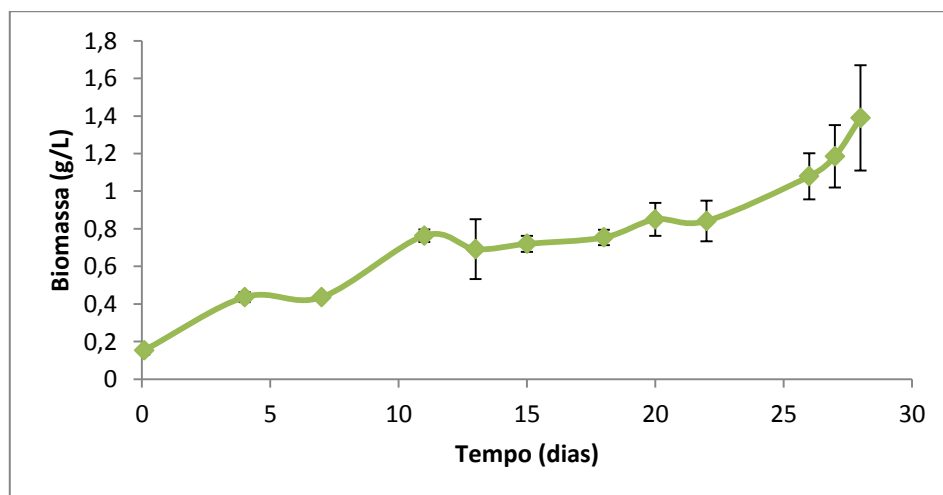


Figura 4.3: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 3 (concentração inicial de NP₉₅EO de 100 mg/L).

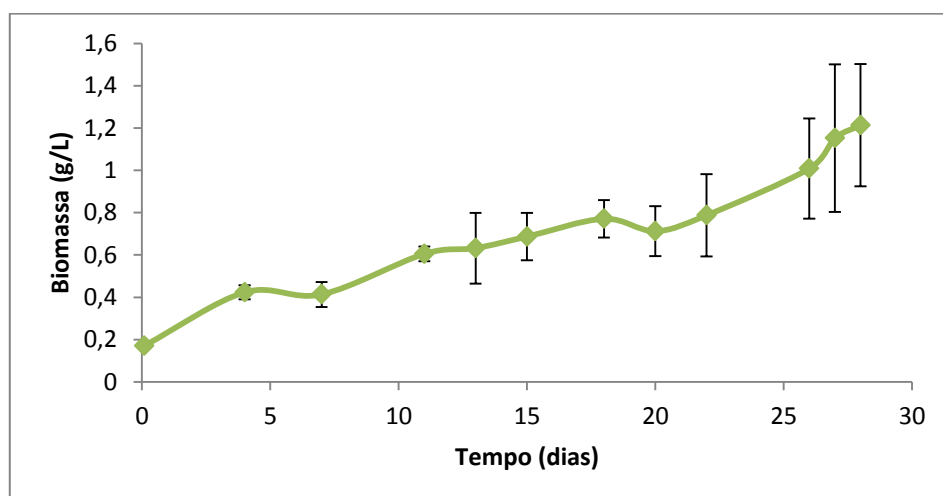


Figura 4.4: Curva da média do crescimento das microalgas no experimento 4 (concentração inicial de NP₉₅EO de 50 mg/L).

Mesmo a absorbância inicial medida para todos os experimentos sendo a mesma, as medidas de peso seco indicaram uma diferença significativa na primeira amostra de cada cultura, demonstrando que as quantidades de microalgas iniciais foram diferentes para os experimentos. Assim, para melhor comparar o crescimento das microalgas, foi feito um gráfico com o percentual de crescimento das culturas relativo à primeira medida de peso seco para cada cultura, o qual se encontra na Figura 4.5.

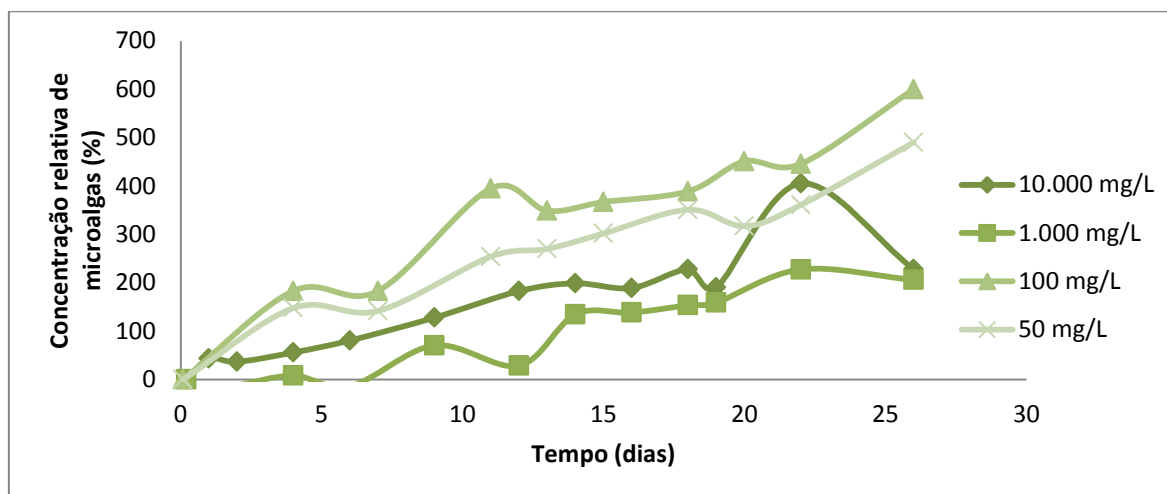


Figura 4.5: Curva do crescimento percentual relativo das culturas dos experimentos de concentração inicial de NP₉₅EO de 10.000, 1.000, 100 e 50 mg/L respectivamente os experimentos 1, 2, 3 e 4.

Com base nos resultados obtidos, observa-se que o a cultura do experimento 3 foi a que mais cresceu, seguida pela 4. As curvas do experimento 1 e 2, de maiores concentrações iniciais de NPEO, possuem uma inclinação inicial menor indicando um crescimento mais lento, provavelmente devido à adaptação das microalgas ao DE. Assim, embora se esperasse que quanto menor fosse a concentração do NPEO no meio, maior seria o crescimento algal, não foi o observado: as microalgas do experimento 1, sendo 10 vezes mais concentrado no poluente que o 2, cresceram mais. Uma possível explicação para esses resultados poderia ser uma relação entre a toxicidade do composto e a maior oferta de carbono orgânico, provenientes da degradação do NP₉₅EO, ou seja, da perda de suas cadeias etoxiladas: as microalgas do experimento 1 e 2 cresceram menos que os experimentos 3 e 4 por estarem em um meio mais tóxico, porém relacionando os experimentos 1 e 2 e 3 e 4 entre si, percebe-se que maior foi o crescimento quanto maior foi a concentração do poluente (ou disponibilidade de carbono orgânico dissolvido). Demonstrando assim, a competitividade de dois fenômenos atuantes: a toxicidade do composto e a maior disponibilidade de carbono presente.

4.1.1 Registro Fotográfico

Nesta seção é apresentado um registro fotográfico dos experimentos ao longo de suas durações, através das Figuras 4.6 a 4.12.

A Figura 4.6 mostra os experimentos 1 e 2 de concentração inicial de NP₉₅EO de 10.000 e 1.000 mg/L, respectivamente, no dia em que as microalgas foram inoculadas. A Figura 4.7 no dia em que tiveram a maior remoção do composto, a Figura 4.8 no 34º dia, onde se pode perceber que o cultivo do experimento 1 começa a apresentar um amarelamento devido à morte dos micro-organismos. E a Figura 4.9 no último dia do experimento, onde as culturas apresentavam-se praticamente mortas.

A Figura 4.10 mostra os experimentos 3 e 4 de concentração inicial de NP₉₅EO de 100 e 50 mg/L, respectivamente, no dia em que as microalgas foram inoculadas. A Figura 4.11 no dia em que tiveram a maior remoção do composto, 18º dia, e a Figura 4.9 no último dia experimental.



Figura 4.6: Experimentos 1 e 2, triplicatas e abiótico (da esquerda à direita) – dia 0 (após a inoculação).

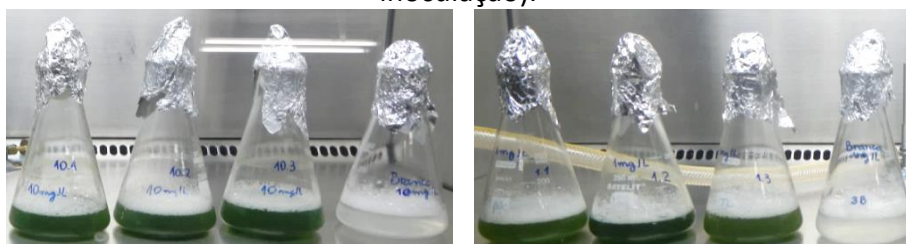


Figura 4.7: . Experimentos 1 e 2, triplicatas e abiótico (da esquerda à direita) –28ºdia.

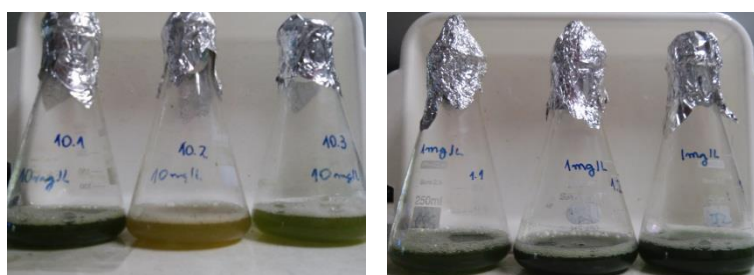


Figura 4.8: Experimentos 1 (à esquerda) e 2 (à direita) no 34º dia.

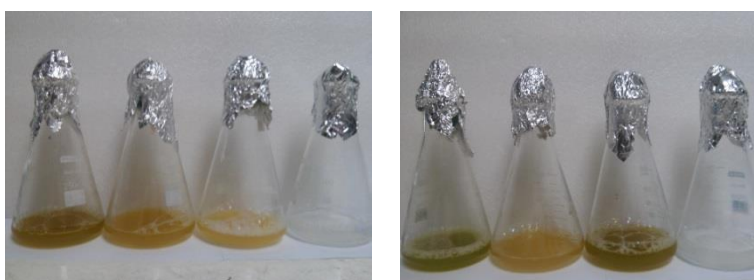


Figura 4.9: Experimentos 1 (à esquerda) e 2 (à direita) no 41º dia.



Figura 4.10: Experimentos 3 e 4, triplicatas e abiótico (da esquerda à direita) – dia 0 (após a inoculação).

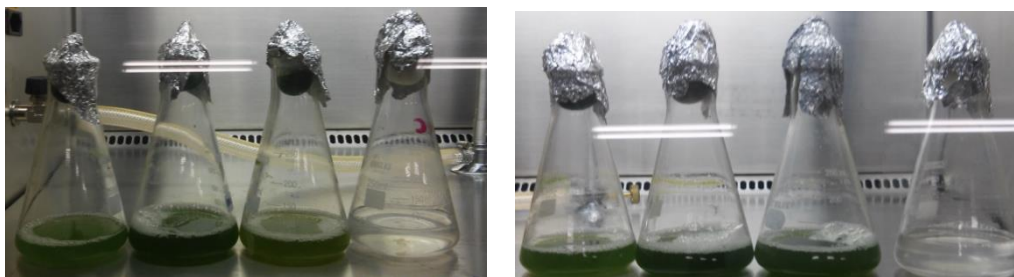


Figura 4.11: Experimento 3 (à esquerda) e 4 (à direita) – 18º dia.

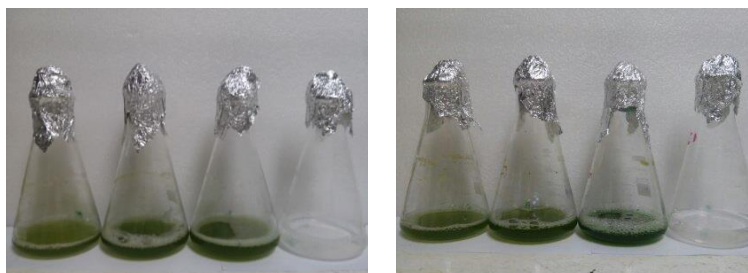
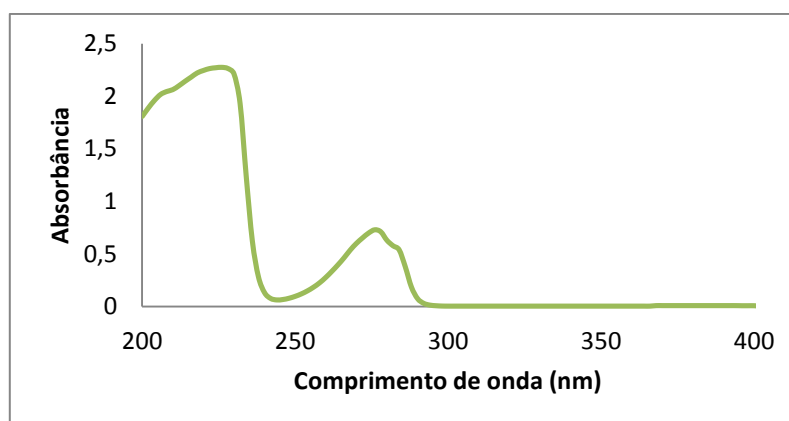


Figura 4.12: Experimento 3 (à esquerda) e 4 (à direita) – 28º dia.

4.2 Remoção de NPnEO

Primeiramente, a fim de conhecer o comprimento de onda do NP₉₅EO foi tomado um espectro de varredura nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm, região esta característica por apresentar picos do composto NPnEO (Wang *et al.*, 2011 ; Silva, 2013 ; Xie *et al.*, 2013). O espectro de absorção obtido encontra-se na Figura 4.13. Foram encontrados dois picos: 222 nm e 277 nm, estando de acordo com (Pons *et al.*, 2004 ; Bonenfant *et al.*, 2009). Optou-se por trabalhar no comprimento de onda de 277 nm, valor este característico do NPnEO (Henriques, 2004 ; Wang *et al.*, 2011).

Figura 4.13: Espectro de absorção do NP₉₅EO.

Posteriormente, foi montada uma curva de calibração de absorção padrão (Figura 4.14), no comprimento de onda escolhido (277 nm). Para isto, foram preparadas soluções com diferentes concentrações conhecidas do NP₉₅EO e medidas suas absorbâncias.

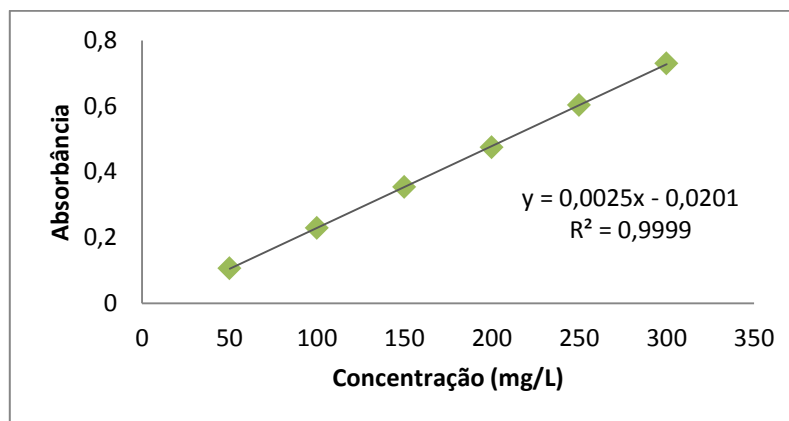


Figura 4.113: Curva de calibração do NP₉₅EO, equação da reta e R-quadrado.

O filtrado obtido através do ensaio de peso seco (item 3.4.2) foi coletado em tubos *falcons* de 15 mL e armazenado em refrigerador a 8°C. Posteriormente, foram medidas as absorbâncias das amostras para analisar a concentração remanescente de NP₉₅EO no meio de cultivo com o uso da curva de calibração. As soluções aquosas do experimento 1 (concentração inicial de 10.000 mg/L) foram diluídas (1:15) em água deionizada antes de medidas as absorbâncias, respeitando os limites de detecção do aparelho.

Optou-se por apresentar os resultados em concentrações de NPnEO (n=1-12) e não NP₉₅EO, pois o produto comercial é uma mistura de NP₉₅EO e outros NPnEO com unidades de etoxilação (n) variando de 1 a 12, conforme explicado na Seção 2.3. Todos os graus de etoxilação dos NPnEO e os compostos resultantes da sua biodegradação (NPnEC e NP) absorvem no mesmo comprimento de onda escolhido, 277 nm (Wang *et al.*, 2011). Assim, na medida em que NPnEO é degradado, são formados NPnEO de menores unidades de etoxilação e outros derivados influenciando na medida de absorbância lida.

Os resultados da concentração de NPnEO mostraram um comportamento padrão: depois de atingido um valor mínimo de concentração de NPnEO, esta começou a aumentar até o final dos experimentos. Optou-se por apresentar aqui os dados dos experimentos até o momento em que, pela análise, o máximo de NPnEO é removido, o que aconteceu no 28º dia para os experimentos 1 e 2 e 18º para os experimentos 3 e 4. Os gráficos encontram-se nas Figuras 4.15, 4.16, 4.17 e 4.18 abaixo. Os resultados de todas as análises amostrais são apresentados no Anexo 3 deste trabalho.

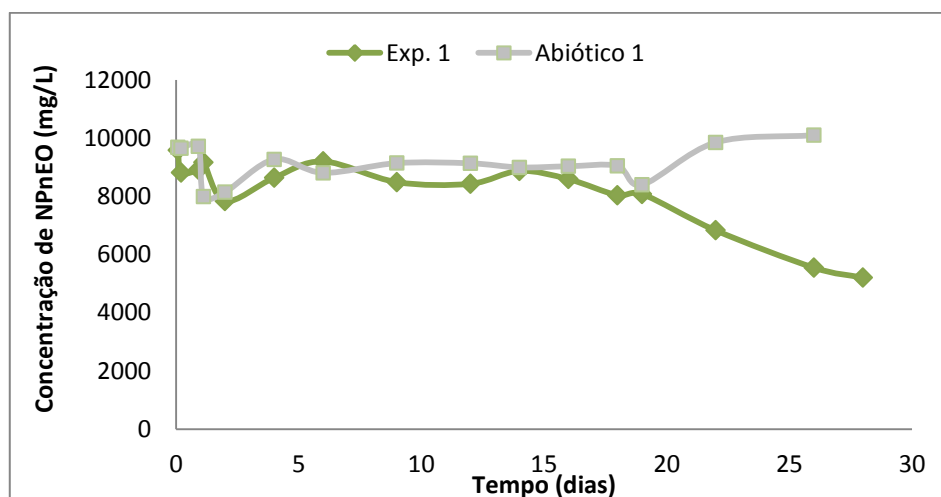


Figura 4.14: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 1 ($C_i = 10.000$ mg/L) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração.

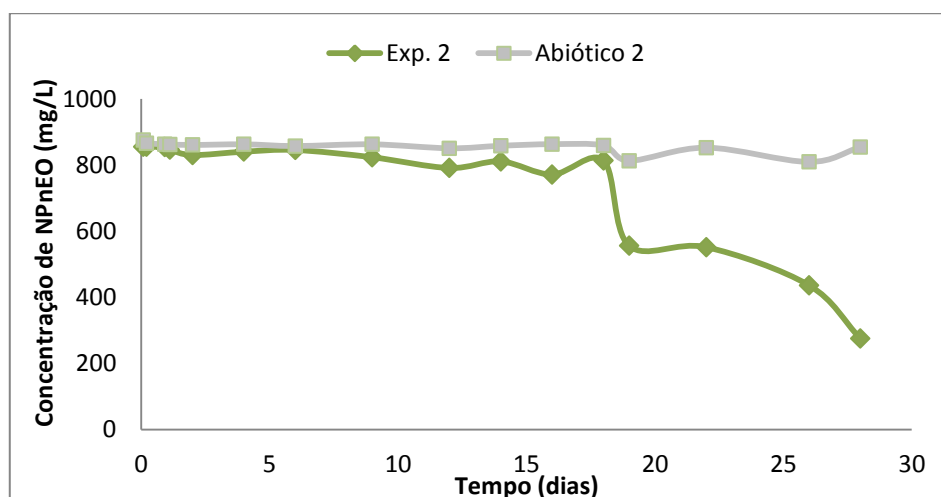


Figura 4.16: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 2 ($C_i = 1.000$ mg/L) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração.

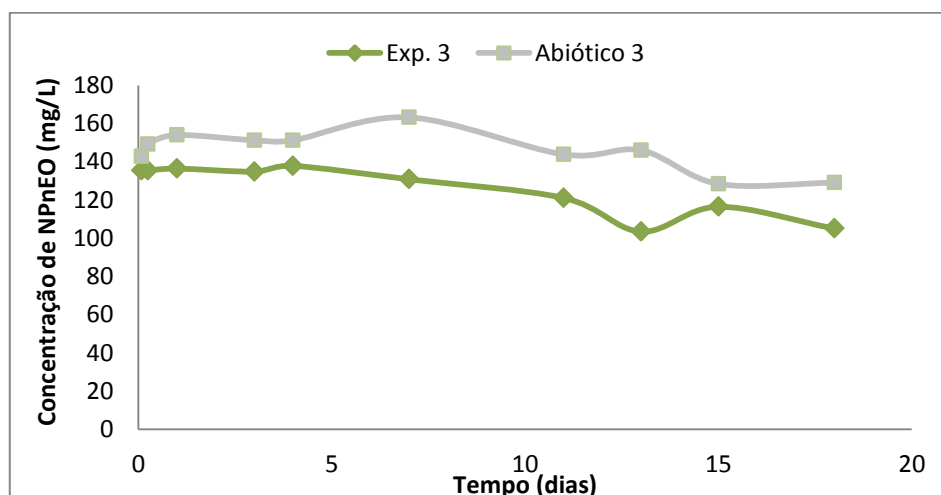


Figura 4.17: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 3 ($C_i = 100$ mg/L) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração.

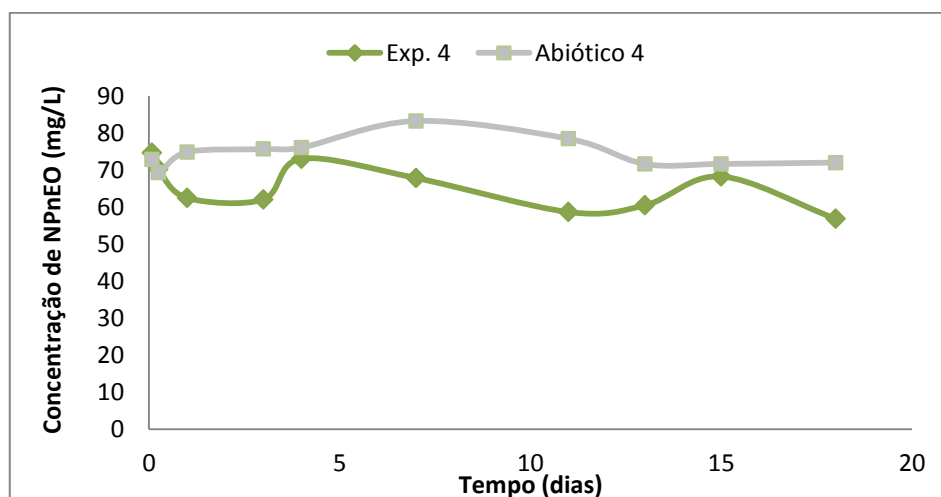


Figura 4.18: Alteração média da concentração de NPnEO com o tempo para o experimento 4 ($C_i = 50$ mg/L) e seu respectivo abiótico de idêntica concentração.

A partir destes dados, foram calculadas as porcentagens de remoções do composto pelas microalgas através da equação 4.1, os resultados encontram-se na Tabela 4.1. O experimento 2 (concentração inicial de NP₉₅EO de 1.000 mg/L) foi o que obteve maior remoção de NPnEO (67,85%), seguido pelo experimento 1 (45,68%), já os experimentos 3 e 4 apresentaram remoções similares e mais baixas (23,85% e 22,44%, respectivamente). Os experimentos abióticos não apresentaram remoção significativa relativa aos experimentos com a presença das microalgas.

$$\%Remoção = \frac{(C_i - C_t)}{C_i} \times 100 \quad (4.1)$$

Onde:

C_i = Concentração de NPnEO da amostra inicial em mg/L

C_t = Concentração de NPnEO da amostra no tempo t em mg/L

Tabela 4.1: Remoção total média de NPnEO dos experimentos e seus respectivos tempo de duração.

Experimento	Concentração inicial de NP ₉₅ EO (mg/L)	Tempo de duração (dias)	Remoção (%)
1	10.000	28	45,68
2	1.000	28	67,85
3	100	18	23,85
4	50	18	22,44

De uma maneira geral, os experimentos não apresentaram uma remoção satisfatória de nonilfenol etoxilado, visto seu potencial efeito aos animais e meio ambiente em mínimas concentrações, o que está de acordo com seu alto poder refratário no meio ambiente (Zhao *et al.*, 2006). Um estudo feito por Lika e Papadakis (2009) relata a importância da oferta de oxigênio para a degradação de compostos fenólicos (Lika e Papadakis, 2009). No presente trabalho, assumiu ser suficiente uma aeração por agitação

dos frascos de acordo com (Lourenço, 2006). Porém, em estudos anteriores com altas remoções de NPnEO e NP utilizou-se aeração mecânica nas culturas. Podendo esta, ser uma causa da baixa remoção do DE no experimento (Gao *et al.*, 2011a ; Gao *et al.*, 2011b).

No estudo realizado por Zhou *et al.* (2013) no qual as microalgas *Scenedesmus obliquus* foram expostas ao nonilfenol em um meio de metanol e meio de cultivo, em condições semelhantes deste experimento e concentrações iniciais de NP variando de 0 a 4 mg/L, obteve-se remoção de quase 100% do composto ao final de 5 dias de experimento. As análises foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e um pré-tratamento das amostras foi realizado por concentração através de microextrações líquido-líquido. Os excelentes resultados deste estudo não podem ser comparados ao presente trabalho, pois nele se utilizou somente nonilfenol e não nonilfenol etoxilado. Estes compostos possuem características diferentes, o nonilfenol é altamente lipofílico diferente do NPEO que possui características hidrofílicas e degradação diferente.

Todavia, deve-se levar em consideração os erros devido ao método de análise escolhido – espectroscopia UV-Vis. Houve interferência do meio de cultivo nas análises, pois este apresentou absorção no comprimento medido (277 nm); não havendo a possibilidade de ser descontado seu valor de absorbância pelo desconhecimento de quanto o meio de cultivo havia sido consumido em cada amostra. Ainda, na degradação do NPnEO há a formação de nonilfenol etoxilados de menores unidades, NPnEC e NP, todos estes absorvem no mesmo comprimento de onda lido (277 nm), impossibilitando uma análise mais acurada da remoção de NPnEO. Este problema poderia ser resolvido com a análise amostral por outros métodos que pudessem separar os compostos e identificá-los, como por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS), como alguns estudos demonstram (Ahel e Giger, 1985 ; Gettar *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2011a ; Sun *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2013).

Um estudo foi realizado por Sun *et al.* (2012), no qual se analisou a bioconcentração e degradação de NPEO pelas microalgas *Chlorella vulgaris*, em condições semelhantes a este trabalho, porém com contração inicial de NPEO de 16,94 mg/L e em erlenmeyers de 3L. As análises foram realizadas através da concentração das amostras por extração em fase sólida e posterior análise em HPLC. Os resultados obtidos demonstraram que até 6 horas as concentrações dos diferentes oligômeros de nonilfenol etoxilado aumentaram e atingiram um máximo, depois começaram a diminuir, exceto pela concentração de NP1EO, NP2EO que sempre aumentou. Com exceção destes dois compostos, os oligômeros de NPEO foram quase completamente degradados em 48 horas de experimento.

5 Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

A microalga *Scenedesmus* sp. mostrou ser resistente ao nonilfenol etoxilado 9,5. Observou-se um crescimento contínuo de todas as culturas realizadas neste trabalho. Elas cresceram em meios extremamente concentrados do composto (10.000 mg/L), demonstrando a possibilidade de serem utilizadas em meio onde o NP₉₅EO é presente, inclusive em altas concentrações.

Nos experimentos realizados, 1, 2, 3 e 4 de concentrações iniciais de NP₉₅EO de 10.000 mg/L, 1.000 mg/L, 100 mg/L e 50 mg/L, respectivamente, a microalga *Scenedesmus* sp. aparentemente não se mostrou eficiente na remoção da substância. O percentual de remoção encontrado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro UV-Vis foi baixo em relação a sua periculosidade em mínimas concentrações no meio ambiente - máximo de 67,85% para o experimento de concentração inicial de NP₉₅EO de 1.000 mg/L.

As baixas remoções e o aumento da concentração de nonilfenol etoxilado nas culturas podem estar associados à formação dos compostos derivados do NP₉₅EO que são absorvidos no mesmo comprimento de onda (277 nm), como nonilfenol etoxilado de menores unidades de etoxilação ($n < 9,5$), nonilfenol (NP) e nonilfenol ácido acético etoxilado (NPnEC). As remoções também podem estar subestimadas devido à interferência do meio de cultivo das microalgas na análise em espectrofotometria, pois foi observada uma absorção do meio no comprimento de onda lido. Sugere-se a análise por outros métodos que possam separar e indentificar os compostos, como por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS).

Os DE causam, em concentrações mínimas (na ordem de ng/L), efeitos alarmantes na saúde de uma população, infertilidade, má-formação do feto e cânceres são alguns deles. Os sistemas de tratamentos de efluentes atuais não removem completamente os DE, isso faz com que sejam despejadas nos corpos hídricos altas cargas destes compostos diariamente, expondo animais e seres humanos a seus efeitos, o que justifica a emergência de uma ação a ser tomada. As microalgas são uma alternativa na remoção destes compostos e poderiam entrar como uma etapa adicional ao sistema convencional de tratamento de efluentes. Apesar da análise das remoções de NP₉₅EO nos experimentos estudados não ter sido satisfatória por meio da análise espectrofotométrica, há a necessidade de uma análise por outros métodos, visto que outros estudos obtiveram resultados promissores. A possibilidade da posterior utilização das microalgas em outras aplicações industriais, principalmente para a produção de biocombustíveis, justifica e valoriza os estudos para a implementação desta tecnologia.

Sugere-se como trabalhos futuros:

- Realizar um experimento com métodos de análise mais eficazes, como por cromatografia, HPLC, GC-MS ou LC-MS;
- Utilizar NPnEO, com $n=1-2$, no meio de cultivo das microalgas, para se ter uma análise da biodegradação completa do NPnEO (remoção de todas as cadeias etoxiladas e quebra do anel benzênico);
- Adicionar somente NP ao meio de cultivo das microalgas para verificar a quebra do anel benzênico pelas microalgas;

- Estudar a remoção do NPnEO pelas microalgas associadas a uma cultura de bactérias anaeróbicas, oferecendo, além de um meio aeróbico, um meio anaeróbico de cultivo (como lodos) para que a formação de NP seja mais rápida e possibilite uma biodegradação total do DE pelas microalgas;
- Testar outras espécies de microalgas, bem como outros disruptores endócrinos;
- Utilizar como meio de cultivo das microalgas uma mistura de disruptores endócrinos para analisar a remoção dos compostos simultaneamente, simulando o que acontece em um efluente real;
- Utilizar como meio de cultivo das microalgas efluentes de diversos segmentos contendo NPnEO.

6 Referências

- Abargues, M. R. ; Ferrer, J. ; Bouzas, A. ; Seco, A. (2013). "Removal and fate of endocrine disruptors chemicals under lab-scale posttreatment stage. Removal assessment using light, oxygen and microalgae." Bioresource Technology **149**: 142-148
- Abdel-Raouf, N. ; Al-Homaidan, A. A. ; Ibraheem, I. B. M. (2012). "Microalgae and wastewater treatment." Saudi Journal of Biological Sciences **19**: 257-275.
- Abdulsada, Z. K. (2014). Evaluation of microalgae for secondary and tertiary wastewater treatment. Dissertação de Mestrado, Carleton University.
- Acosta, K. ; Cuvilier, L. ; Pedersen, B. (2004-2005). European Union Regulation of Endocrine Disrupting Chemicals taht Affect Reproduction: From Rachel to REACH, International Master of Science in Environmental Policy and the Global Challenge: 1-168.
- Ahel, M. ; Conrad, T. ; Giger, W. (1987). "Persistent Organic Chemicals in Sewage Effluents." Environmental Science Technology **21**: 697-703.
- Ahel, M. ; Giger, W. (1985). "Determination of Nonionic Surfactants of the Alkylphenol Polyethoxylate Type by High-Performance Liquid Chromatography." Analytical Chemistry **57**: 2584-2590.
- Ahel, M. ; Giger, W. ; Koch, M. (1994a). "Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment - I. Occurance and Transformations in Sewage Treatment." Water Research **28**(5): 1131-1142.
- Ahel, M. ; Giger, W. ; Schaffner, C. (1994b). "Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environmen - II. Occurance and transformation in rivers." Water Research **28**(5): 1143-1152.
- Aquino, S. F. d. ; Brandt, E. M. F. ; Chernicharo, C. A. d. L. (2013). "Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura." Engenharia Sanitária Ambiental **18**(3): 187-204.
- Barcelo, D. ; Petrovic, M. (2000). "Determination of anionic and nonanionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry." Analytical Chemistry **72**: 4560-4567.
- Barcelo, D. ; Petrovic, M. (2001). "Determination of phenolic xenoestrogens in environmental samples by liquid chromaography with mass spectrometric detection." Journal of AOAC International **84**: 1074-1085.
- Barcelos, D. ; Lacorte, S. ; Hildebrandt, A. (2007). "Assessment ot priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin." Analytical Bioanalysis Chemistry **387**: 1459-1468.
- Batista, A. P. ; Ambrosano, L. ; Graça, S. ; Sousa, C. ; Marques, P. ; Ribeiro, B. ; Botrel, E. ; Neto, P. ; Gouveia, L. (2014). "Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production - An Integrated microalgae-based approach." Bioresource Technology.
- Benotti, M. J. ; Trenholm, R. ; Vanderford, B. J. ; Holady, J. C. ; Stanford, B. D. ; Snyder, S. A. (2009). "Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water." Environmental Science Technology **43**: 597-603.
- Bergman, A. ; Heindel, J. J. ; Jobling, S. ; Kidd, K. A. ; Zoeller, R. T. (2012). State of science of endocrine disrupting chemicals. U. N. E. P. a. W. H. Organization. Suíça.

Bergman, A. ; Skakkebaek, N. E. ; Byléhn, A. S. ; Iguchi, T. ; Toppari, J. ; Woodruff, T. J. (2013). "The Impact of Endocrine Disruptors: A Consensus Statement on the State of the Science." Environmental Health Perspectives **121**(4): 104-106.

Bila, D. M. ; Dezotti, M. (2007). "Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências." Química Nova **30**(3): 651-666.

Blackburn, M. A. ; Waldock, J. M. ; Kirby, J. S. (1999). "Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries." Marine Pollution Bulletin **38**: 109-118.

Blázquez, A. H.-D. M. L. S. R.-M. T. V. D. B. P. (2015). "Microalgae cultivation on wastewater digestate: *b*-estradiol and 17 α -ethynylestradiol degradation and transformation products identification." Journal of Environmental Management **155**: 106-113.

Bolz, U. ; Korner, W. ; Hagenmaier, H. (2001). "Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany." Environmental Pollution **115**: 291-301.

Bonenfant, D. ; Niquette, P. ; Mimeault, M. ; Futos-Mater, A. ; Hausler, R. (2009). "UV-VIS and FTIR spectroscopic analyses of inclusion complexes of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate with *b*-cyclodextrin." Water Research **43**: 3575-3581.

Braunbeck, T. ; Erdinger, L. ; Farber, H. ; Brack, W. ; Islinger, M. ; Holtey-Weber, R. ; Durr, M. ; Hollert, H. (2005). "Endocrine disruption of water and sediment extracts in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay using isolated hepatocytes of rainbow trout: deficiencies between bioanalytical effectiveness and chemically determined concentrations and how to explain them." Environmental Science Pollution **12**: 347-360.

Brausch, J. M. ; Rand, G. M. (2011). "A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity." Chemosphere **82**: 1518-1532.

Cabanelas, I. T. D. ; Arbib, J. R. Z. ; Chinalia, F. A. ; Garrido-Perez, C. ; Rogalla, F. ; Nascimento, I. A. ; Perales, J. A. (2013). "Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal." Bioresource Technology **131**: 429-436.

Cai, Q.-Y. ; Huang, H.-J. ; Lü, H. ; Mo, C.-H. ; Zhang, J. ; Zeng, Q.-Y. ; Tian, J.-J. ; Li, Y.-W. ; Wu, X.-L. (2012). "Occurrence of Nonylphenol and Nonylphenol Monoethoxylate in Soil and Vegetables from Vegetable Farms in the Pearl River Delta, South China." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **63**: 22-28.

Calafat, A. M. ; Needham, L. L. ; Ye, X. Y. ; Wong, L.-Y. ; Reidy, J. A. (2008a). "Urinary concentrations of triclosan in the U.S population: 2003–2004." Environmental Health Perspectives **116**: 303-307.

Calafat, A. M. ; Ye, X. Y. ; Wong, L.-Y. ; Reidy, J. A. ; Needham, L. L. (2008b). "Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004." Environmental Health Perspectives **116**: 39-44.

Casals-Casas, C. ; Desvergne, B. (2010) "Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption." The Annual Review of Physiology DOI: 10.1146/annurev-physiol-012110-142200.

Chisti, Y. (2004). Microalgae: our marine forests. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. A. Richmond, Oxford: 566.

Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." Biotechnology Advances **25**: 294-306.

- Cho, S. ; Lee, N. ; Park, S. ; Yu, J. ; Luong, T. T. ; Oh, Y.-K. ; Lee, T. (2013). "Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources." Bioresource Technology **131**: 515-520.
- Colburn, T. ; Thayer, K. (2000). "Harbingers of Endocrine Disruption." Ecological Applications **10**(4): 949-957.
- Correa-Reyes, G. ; Viana, M. T. ; Marquez-Rocha, F. J. ; Licea, A. F. ; Ponce, E. ; Vazquez-Duhalt, R. (2007). "Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain." Chemosphere **68**: 662-670.
- Crane, M. ; Watts, C. ; Boucard, T. (2006). "Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals." Science of the Total Environment **367**: 23-41.
- Derner, R. b. ; Ohse, S. ; Villela, M. ; Carvalho, S. M. d. ; Fett, R. (2006). "Microalgas, produtos e aplicações." Ciência Rural **36**: 1959-1967.
- Ding, W. H. ; Liu, L. L. ; Cheng, Y. C. (2006). "Occurrence and seasonal variation of alkylphenols in marine organisms from the coast of Taiwan." Chemosphere **65**: 2152-2159.
- ECHA (2013). Support document for identification of 4-nonylphenol, branched and linear, ethoxylated as substances of very high concern. E. C. Agency.
- Eddy, M. ; Asano, T. ; Burton, F. ; Leverenz, H. (2007). "Characteristics of Municipal Wastewater and Related Health and Environmental Issues." Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications.
- Esteban, S. ; Gorga, M. ; Petrovic, M. ; González-Alonso, S. ; Barceló, D. ; Valcárcel, Y. (2014). "Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain." Science of the Total Environment **466-467**: 939-951.
- Fernandes, T. J. M. (2012). Contribuição para o estudo da presença de disruptores endócrinos em lamas de ETAR. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.
- Ferreira, A. P. (2012). "Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente." Revista Brasileira de Farmácia **93**(2): 255-264.
- Fontenele, E. ; Martins, M. ; Quidute, A. R. ; Júnior, R. M. M. (2009). "Contaminantes Ambientais e os interferentes endócrinos." Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia **54**: 6-16.
- Funari, E. ; Fabietti, F. ; Delise, M. ; Ferrara, F. ; Ademollo, N. (2008). "Nonylphenol and octylphenol in human breast milk." Environment International **34**: 984-987.
- Furlong, E. T. ; Meyers, M. T. ; Thurman, E. M. ; Zaugg, S. D. ; Barber, L. B. ; Buxton, H. T. ; Kolpin, D. W. (2002). "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance." Environmental Science Technology **36**: 1202-1211.
- Galembeck, E. (1996). Propriedades Físico-Químicas e Interação com Membranas Biológicas dos Surfactantes Não-Iônicos da Série Renex (nonylphenol etoxilado). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- Gao, Q. T. ; Wong, Y. S. ; Tam, N. F. Y. (2011a). "Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species." Marine Pollution Bulletin **63**: 445-451.

- Gao, Q. T. ; Wong, Y. S. ; Tam, N. F. Y. (2011b). "Removal and biodegradation of nonylphenol by immobilized *Chlorella vulgaris*." Bioresource Technology **102**: 10230-10238.
- Gatidou, G. ; Lekkas, T. D. ; Stasinakis, A. S. ; Thomaidis, S. N. (2007). "Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1138**: 32-41.
- Gattullo, C. E. ; Bährs, H. ; Steinberg, C. E. W. ; Loffredo, E. (2012). "Removal of bisphenol A by the freshwater green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter." Science of the Total Environment **416**: 501-506.
- Ge, L. ; Deng, H. ; Wu, F. ; Deng, N. (2008). "Microalgae-promoted photodegradation of two endocrine disrupters in aqueous solution." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **84**: 331-336.
- Gettar, R. T. ; ;, J. F. M. ; Becquart, T. ; Thiele, B. ; Batistoni, D. A. ; Babay, P. A. (2007). "Column temperature as an active variable in the isocratic, normal phase high-performance liquid chromatography separation of lipophilic metabolites of nonylphenol ethoxylates." Journal of Chromatography A **1157**: 227-236.
- Giger, W. ; Gabriel, F. L. P. ; Jonkers, N. ; Wettstern, F. E. ; Kohler, H.-P. E. (2009). "Environmental fate of phenolic endocrine disruptors: field and laboratory studies." Physiological Transactions: Mathematical Physiscal and Engineering Sciences **367**: 3941-3963.
- Giger, W. ; McEvoy, J. ; Ahel, M. (1993). "Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in fresh- water organisms." Environmental Pollution **79**: 243-248.
- Giger, W. ; Schaffner, C. ; Brunner, P. (1984). "4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants." Science **225**: 623-625.
- Goméz-Rico, M. F. ; Cortina, J. ; Disante, K. ; Fuentes, D. ; Vera, J. ; Font, R. (2008). "Degradation of organic pollutants in Mediterranean forest soils amended with sewage sludge." Chemosphere **71**: 2129-2138.
- Guieysse, B. ; Jefferson, B. ; Cartmell, E. ; Lester, J. N. ; Soares, A. (2008). "Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewater." Environmental International **34**: 1033-1049.
- He, H. ; Yu, J. ; Chen, G. ; Li, W. ; He, J. ; Li, H. (2012). "Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*." Ecotoxicology and Environmental Safety **80**: 91-96.
- Hegewald, E. H. (1997). "Taxonomy and Phylogeny of *Scenedesmus*." The Korean Journal of Phycology **12**(4): 235-246.
- Henriques, D. M. (2004). Degradação de nonilfenol polietoxilado e de efluente têxtil por meio de eletrocoagulação e processos fenton, Universidade Federal de Santa Maria.
- Henriques, M. L. G. d. S. (2008). Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: otimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa.
- Inoue, T. ; Fujimoto, Y. ; Uchiyama, T. ; Makino, M. ; Yamashita, N. ; Horii, Y. ; Katase, T. ; Kim, S. Y. (2005). "Estrogen equivalent concentration of individual isomer-specific 4-nonylphenol in Ariake sea water, Japan." Marine Pollution Bulletin **51**: 850-856.

- Jardim, W. F. ; Ghiselli, G. (2007). "Interferentes endócrinos no ambiente." Química Nova **30**(3): 695-706.
- Jones, D. M. ; Cooper, D. W. ; Gill, M. E. ; Frid, C. L. J. ; Lye, C. M. (1999). "Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries." Environmental Science Technology **33**: 1009-1014.
- Jonkers, N. ; Hendriks, R. ; Kwast, O. ; de Voogt, P. (2000). "Alkylphenol ethoxylates and their degradation products in abiotic and biological samples from the environment." Analysis **28**: 776-782.
- Jonsson, J. A. ; Persson, P. ; Bowadt, S. ; Klint, K. ; Cohen, A. (2001). "Routine analysis of alcohol and nonylphenol polyethoxylates in wastewater and sludge using liquid chromatography-electro spray mass spectrometry." Journal of Chromatography A **927**: 103-110.
- JST. (2015). "Scenedesmus brasiliensis." Japan Science and Technology Corporation Retrieved 05/05/2015, 2015, from http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/scenedesmus/brasiliensis/sp_07.html.
- Jurgens, M. ; Johnson, A. (2003). "Endocrine active industrial chemicals: release and occurrence in the environment." Pure and Applied Chemistry **75**: 1895-1904.
- Ki, M.-K. ; Kabra, A. N. ; Choi, J. R. ; Hwang, J.-H. ; Kim, J. R. ; Aboud-Shanab, Y.-. ; Jeon, Y.-K. O. B.-H. (2014). "Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamidomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*." Ecological Engineering **73**: 260-269.
- Kim, J. ; Korshin, G. V. ; Velichenko, A. B. (2005). "Comparative study of eletrochemical degradation and azonation of nonylphenol." Water Research **39**: 2527-2534.
- Kiran, B. ; Pathak, K. ; Kumar, R. ; Deshmukh, D. (2014). "Cultivation of *Chlorella sp.* IM-01 in municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production." Ecological Engineering **73**: 326-330.
- Li, X. ; Ying, G.-G. ; Zhao, J.-L. ; Chen, Z.-F. ; Lai, H.-J. ; Su, H.-C. (2013). "4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels." Environmental International **52**: 81-86.
- Lika, K. ; Papadakis, I. A. (2009). "Modeling the bodegradation of phenolic compounds by microalgae." Journal of Sea Research **62**: 135-146.
- Liu, Y. ; Dai, X. ; Wei, J. (2013). "Toxicity of the xenoestrogen nonylphenol and its biodegradation by the alga *Cyclotella caspia*." Journal of Environmental Sciences **25**(8): 1662-1671.
- Lopes, L. G. (2008). "Hormônios Estrogênicos no Ambiente e Eficiência das Tecnologias de Tratamento para Remoção em Água e Esgoto " Revista Brasileira de Recursos Hídricos **13**(4): 123-131.
- Lourenço, S. O. (2006). Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações. São Carlo, SP, Rima.
- Lürling, M. (1999a). The Smell of Water: Grazer-Induced Colony Formation in Scenedesmus. Thesis, Agricultural University of Wageningen.
- Lürling, M. (1999b). The Smell of Water: Grazer-Induced Colony Formation in Scenedesmus. Dissertação de Mestrado, Agricultural University of Wageningen.

- Lürling, M. ; Donk, E. V. (2000). "Grazer-Induced Colony Formation in *Scenedesmus*: Are There Costs to Being Colonial?" *Oikos* 88(1): 111-118.
- Marques, R. J. F. (2013). Produção de biodiesel pelas microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp. : otimização dos processos de pré-tratamento e conversão. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa.
- Martin, O. V. ; Voulvoulis, N. (2014). "Sustainable Risk Management of Emerging Contaminants in Municipal Wastewaters." *Physiological Transactions: Mathematical Physical and Engineering Sciences* 367(1904): 3895-3922.
- Martínez, M. E. ; Sánchez, S. ; Jiménez, J. M. ; Yousfi, F. E. ; Muñoz, L. (2000). "Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*." *Bioresource Technology* 73: 263-272.
- Matamoros, V. ; Gutiérrez, R. ; Ferrer, I. ; García, J. ; Bayona, J. M. (2015). "Capability of Microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study." *Journal of Hazardous Materials* 288: 34-42.
- Metcalfe, C. D. ; Bennett, E. R. (2000). "Distribution of degradation products of alkylphenol ethoxylates near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, North America." *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 784-792.
- Milinic, J. ; Lacorte, S. ; Rigol, A. ; Vidal, M. (2015). "Sorption behaviour of nonylphenol and nonylphenol monoethoxylate in soils." *Chemosphere*.
- Miranda, J. R. P. d. C. (2011). Produção de Bioetanol a partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.
- Olovsson, M. ; Sahlin, L. ; Bredhult, C. (2009). "Gene expression analysis of human endometrial endothelial cells exposed to bisphenol A." *Reproductive Toxicology* 28: 18-25.
- Papazi, A. ; Kotzabasis, K. (2013). "'Rational' Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga *Scenedesmus obliquus*." *Plos ONE* 8(4).
- Park, J. B. K. ; Craggs, R. J. ; Shilton, A. N. (2011). "Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production." *Bioresource Technology* 102: 35-42.
- Pellón, A. ; Rodríguez, M. ; González, O. ; Frades, J. (2011). "Remoción de cromo mediante el uso de un bioreactor utilizando *Scenedesmus obliquus* inmovilizado." *Ingeniería Hidráulica y Ambiental* 32(1): 13-20.
- Peng, F.-Q. ; Ying, G.-G. ; Yang, B. ; Liu, S. ; Lai, H.-J. ; Liu, Y.-S. ; Chen, Z.-F. ; Zhou, G.-J. (2014). "Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): Transformation kinetics and products identification." *Chemosphere* 95: 581-588.
- Peres, M. R. (2011). Remoção dos interferentes endócrinos 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e 4-nonilfenol por adsorção em carvão ativado em pó em água de abastecimento público. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- Pinto, G. M. F. ; Pinta, J. F. ; Filho, R. M. (2007). "Avaliação de contaminação ambiental causada por poluentes orgânicos persistentes utilizando simulação computacional." *Química Nova* 30(3): 565-568.
- Pons, M.-N. ; Bonté, S. L. ; Potier, O. (2004). "Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation." *Journal of Biotechnology* 113: 211-230.

Priac, A. ; Morin-Crini, N. ; Druart, C. ; Gavaille, S. ; Bradu, C. ; Lagarrigne, C. ; Torri, G. ; Winterton, P. ; Crini, G. (2014). "Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination." Arabian Journal of Chemistry.

Raecker, T. ; Prast, H. ; Kleist, E. ; Thiele, B. ; Heinke, V. ; Guenther, K. (2002). "Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food." Environmental Science Technology **36**: 1676-1680.

Raimundo, C. C. M. (2007). Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.

Ramirez, N. N. V. (2013). Estudo do Crescimento da Microalga *Scenedesmus* sp. em Vinhaça. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Reinhard, M. ; Montgomery-Brown, J. (2003). "Occurrence and behavior of alkylphenol polyethoxylates." Environmental Engineering Science **20**: 471-486.

Rodrigues, L. L. R. (2008). Biodiversidade de Cianobastérias e Algas da Represas Billing (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil. . Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

Schimitz, R. ; Magro, C. D. ; Colla, L. M. (2012). "Aplicações Ambientais de Microalgas." Revista CIATEC - UPF **4**(1): 48-69.

Schlatter, C. ; Schmid, P. ; Muller, S. (1998). "Evaluation of the estrogenic potency of nonylphenol in non-occupationally exposed humans." Environmental Toxicology and Pharmacology **6**: 27-33.

Silva, F. V. d. ; Rodrigues, J. L. ; Batista, B. L. ; Oliveira, D. P. d. (2007). "Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: uma visão ambiental." Revista Brasileira de Toxicologia **20**: 1-12.

Silva, S. W. d. (2013). Fotoeletrooxidação na degradação de nonilfenol etoxilado em águas residuárias. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sun, H.-W. ; Hu, H.-W. ; Wang, L. ; Yang, Y. ; Huang, G.-L. (2012). "The Bioconcentration and Degradation of Nonylphenol and Nonylphenol Polyethoxylates by *Chlorella vulgaris*." International Journal of Molecular Sciences **15**: 1255-1270.

Takada, H. ; Isobe, T. (2004). "Determination of degradation products of alkylphenol polyethoxylates in municipal wastewaters and rivers in Tokyo, Japan." Environmental Toxicology and Chemistry **23**: 599-605.

Telfer, G. ; Mackie, C. ; Kyle, C. E. ; Rhind, S. M. (2007). "Effects of exposure of ewes to sewage sludge-treated pasture on phthalate and alkyl phenol concentrations in their milk." Science of the Total Environment **383**: 70-80.

Torrents, A. ; Rice, P. C. ; Loyo-Rosales, E. J. (2007). "Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography /tandem mass spectrometry." Chemosphere **68**: 2118-2127.

Torres, H. S. d. J. (2014). Cultivo de Microalgas em Efluente de Tratamento Anaeróbio de Esgoto. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo.

Tsutsumi, O. (2005). "Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **93**(2-5): 325-330.

Vethaak, D. A. (2005). "An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands." Chemosphere **59**: 511-524.

Wang, P. ; Nong, X.-H. ; Ge, J.-H. (2011) "Aerobic biodegradation of nonylphenol ethoxylates in shaking-flask test." Electronic Journal of Biotechnology DOI: 10.2225/vol14-issue4-fulltext-1.

Xie, X. ; Lü, W. ; Chen, X. (2013). "Binding of the endocrine disruptors 4-terc-octylphenol and 4-nonylphenol to human serum albumin." Journal of Hazardous Materials **248-249**: 347-354.

Ying, G.-G. ; Williams, B. ; Kookana, R. (2002). "Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review." Environmental International **28**: 215-226.

Zeng, X. ; Guo, X. ; Su, G. ; Danquah, M. ; Zhang, S. ; Lu, Y. ; Sun, Y. ; Lin, L. (2015). "Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production." Renewable and Sustainable Energy Review **42**: 1385-1392.

Zhao, J. ; Zhang, G. ; Qin, Y. ; Zhao, Y. (2006). "Aerobic biodegradation of alkylphenol ethoxylates." Bioresource Technology **97**: 2478-2480.

Zhou, G.-J. ; Peng, F.-Q. ; Yang, B. ; Ying, G.-G. (2013). "Cellular responses and bioremoval of nonylphenol and octylphenol in the freshwater green microalga *Scenedesmus obliquus*." Ecotoxicology and Environmental Safety **87**: 10-16.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1 - Resultados dos experimentos 5 e 6

Neste anexo serão apresentados os resultados encontrados para os experimentos 5 e 6. A Figura 1 mostra o crescimento das microalgas no decorrer do experimento. As Figuras 2 e 3 apresentam as concentrações de NP₉₅EO dos experimentos 5 e 6 concentração inicial de 1 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente.

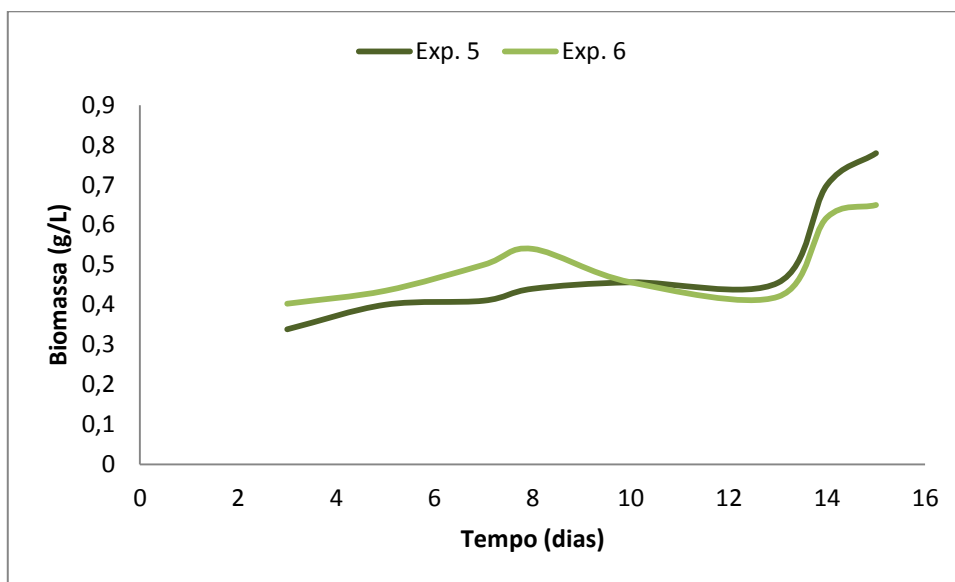


Figura A.1: Curva de crescimento das microalgas nos experimentos 5 e 6.

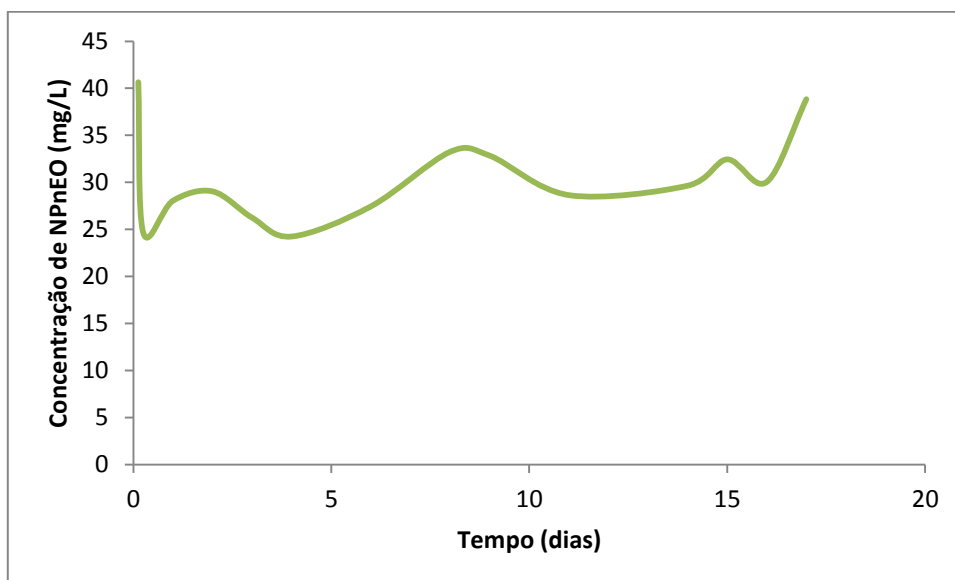


Figura A.2: Alteração da concentração de NP95EO com o tempo do experimento 5.

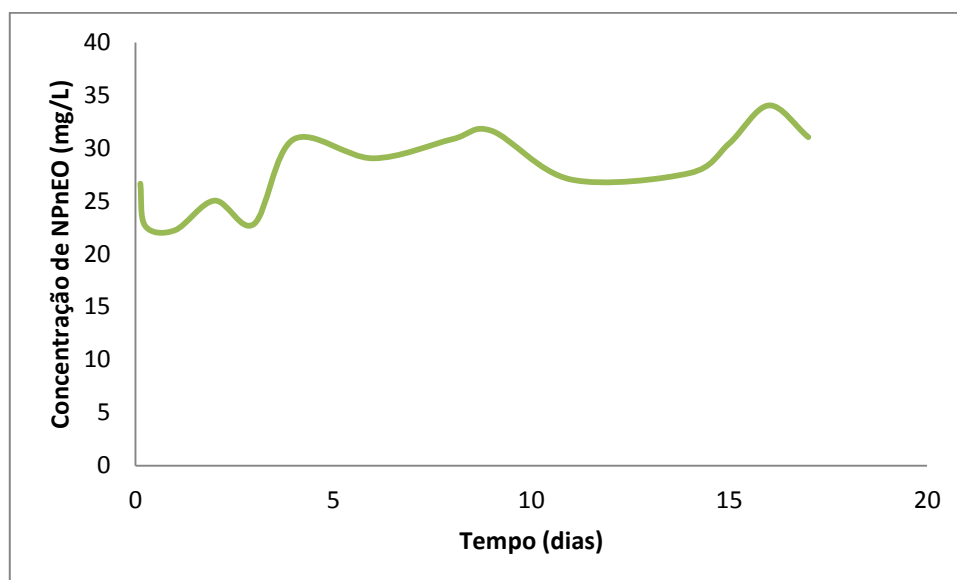


Figura A.3: Alteração da concentração de NP95EO com o tempo do experimento 6.

7.2 Anexo 2: Curvas de Abs x Concentração dos experimentos

Neste anexo, serão apresentados os gráficos de absorvância versus concentração de microalgas, que como de acordo com a lei de Beer-Lambert, segue uma relação linear.

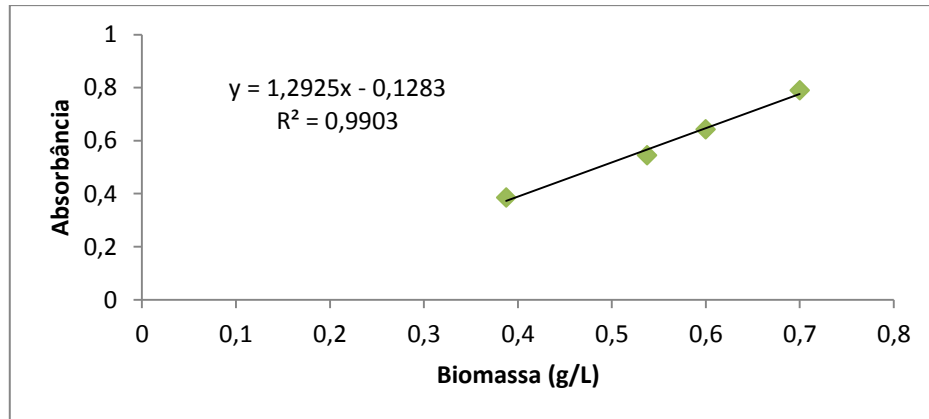


Figura A.4: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 1.

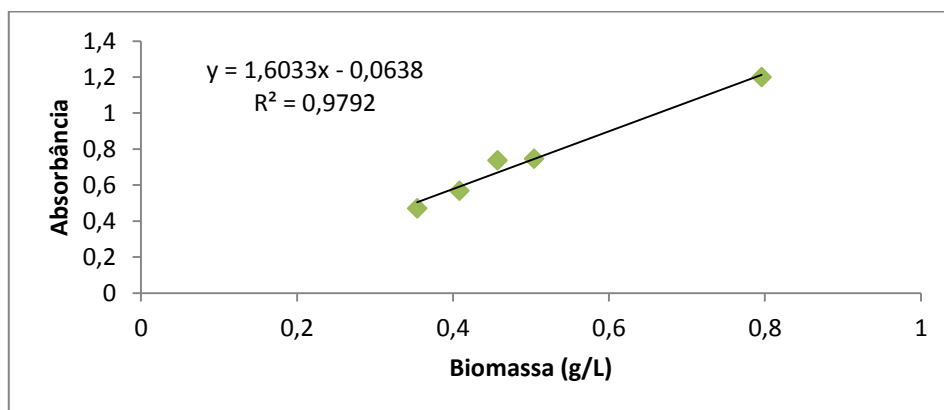


Figura A.5: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 2.

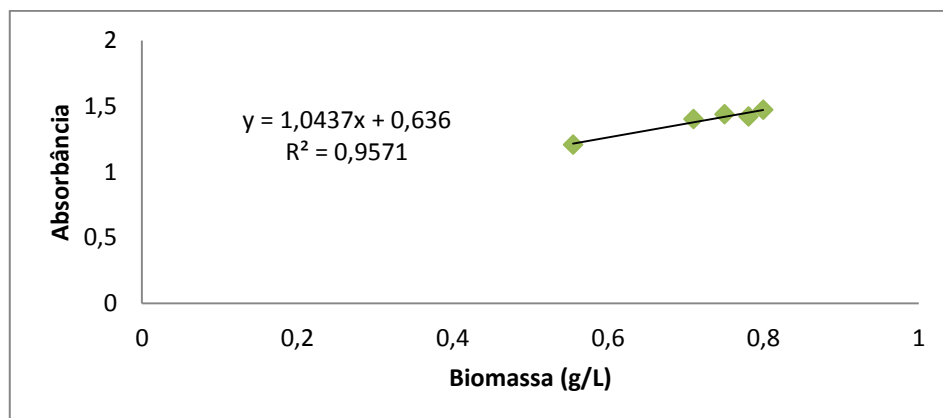


Figura A.6: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 3.

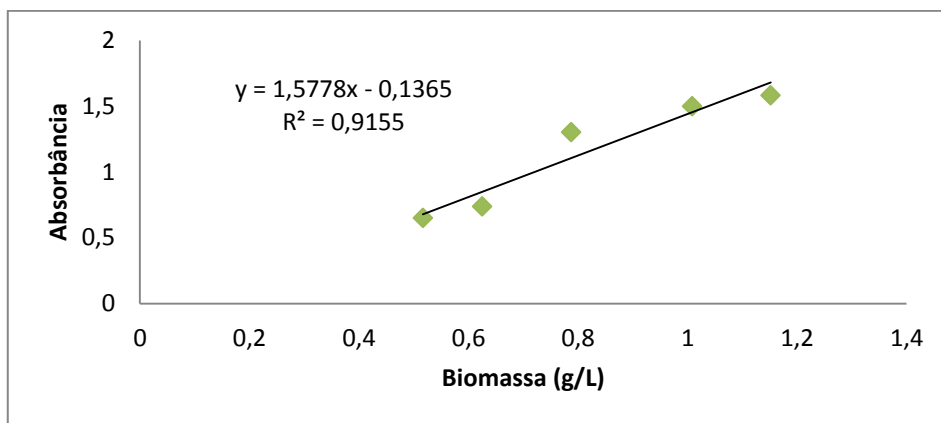


Figura A.7: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 4.

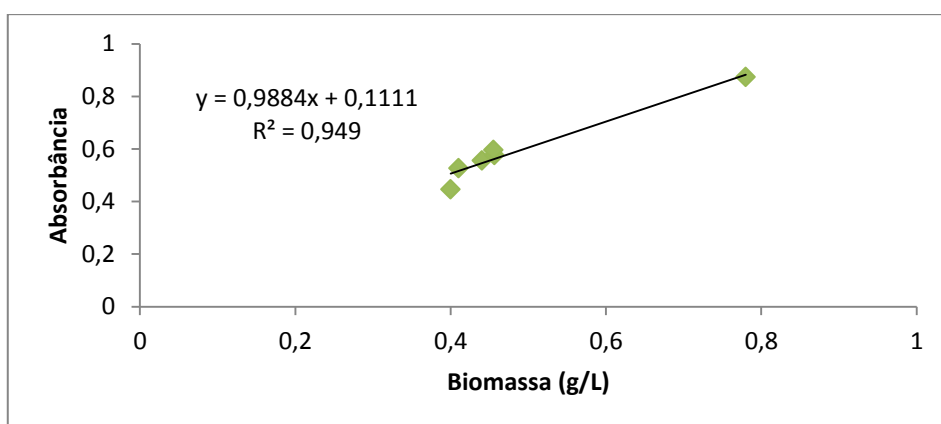


Figura A.8: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 5.

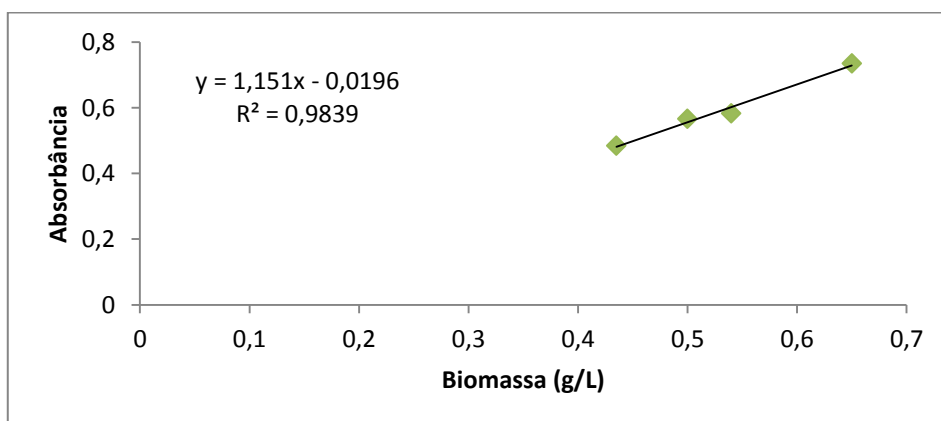


Figura A.9: Reta de calibração de acordo com Lei de Beer-Lambert do experimento 6.

7.3 Anexo 3 - Concentração de NPnEO durante todo o tempo experimental

Gráficos das concentrações de NPnEO dos experimentos 1, 2, 3 e 4 durante todo o tempo experimental, onde pode-se ver que as remoções finais obtiveram um aumento na concentração de NPnEO de aproximadamente a 55 e 68% em relação aos valores iniciais.

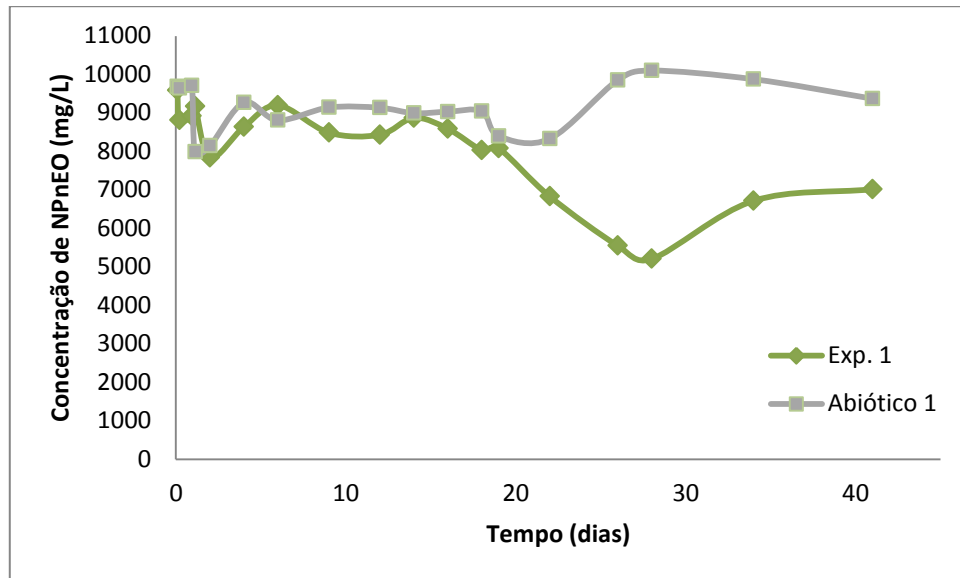


Figura A.10: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 1.

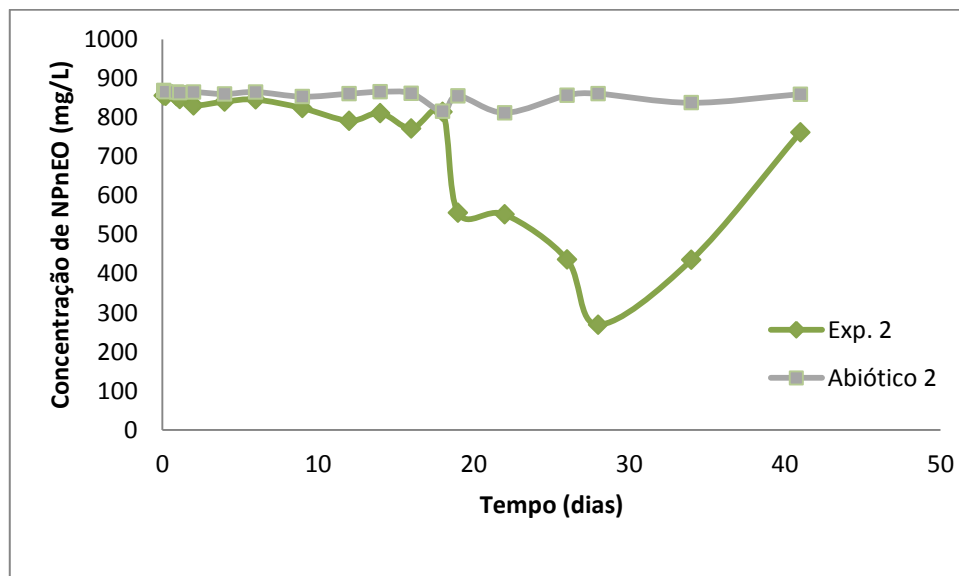


Figura A.11: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 2.

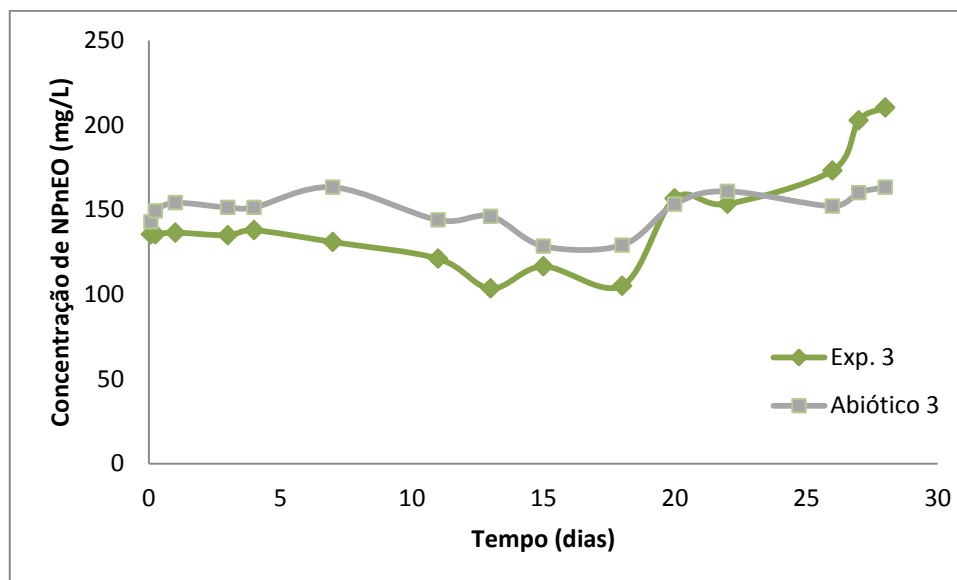


Figura A.12: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 3.

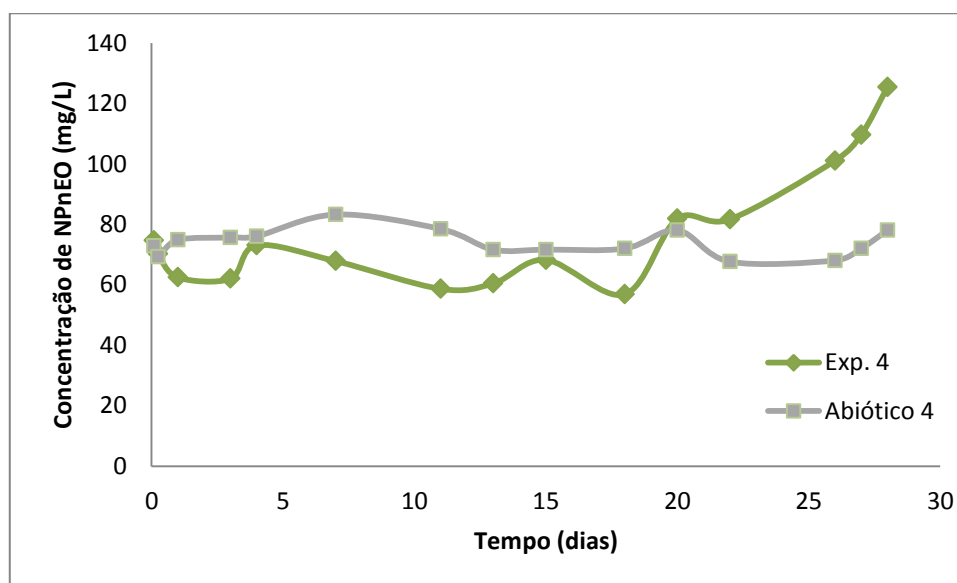


Figura A.13: Variação da concentração de NPnEO durante o tempo experimental em dias do experimento 4.