

# Utilização de microrganismos na degradação de hormônios estrógenos

Daniel Lauxen Spohr<sup>1</sup>

Eduardo Cirio<sup>2</sup>

Tânia Mara Pizzolato<sup>3</sup>

Carla Kereski Ruschel<sup>4</sup>

## Resumo

Estrógenos são hormônios importantes para o desenvolvimento sexual e reprodutivo, principalmente para mulheres. O termo estrógeno refere-se a todos os hormônios quimicamente similares, tais como a estrona, o estradiol e o estriol, que são naturais, além do sintético 17 $\alpha$ -etilnilestradiol, presente na maioria dos contraceptivos. Estudos recentes demonstram a presença desses compostos no corpos hídricos e nos efluente domésticos. Neste trabalho, propõe-se alternativa para a degradação desses compostos através da biorremediação. Foram avaliadas duas bactérias, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus thuringiensis*. Avaliou-se também a ação do ferro, visto que é uma substância amplamente encontrada no meio ambiente. Na realização dos experimentos, combinações diferentes foram testadas, tendo como parâmetros, para a superfície de resposta, os dois tipos de microrganismos e o ferro. Os resultados obtidos mostraram que houve diminuição da concentração inicial em todos as combinações, sendo que o melhor resultado foi apresentado pelo *Bacillus thuringiensis* com taxa média de degradação de 82%.

**Palavras-chave:** Biorremediação. *Pseudomonas fluorescens*. *Bacillus thuringiensis*.

## Abstract

Estrogens are important hormones for sexual and reproductive development, especially for women. The term estrogen refers to all chemically similar hormones such as estrone, estradiol and estriol, which are natural, besides the synthetic 17 $\alpha$ -ethylnilestradiol, present in most contraceptives. Recent studies demonstrate the presence of these compounds in water bodies and domestic effluent. In this article, it is proposed an alternative to the degradation of these compounds through bioremediation. Two bacteria, *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus thuringiensis*, were evaluated. It was also assessed the action of the iron as it is a substance widely found in the environment. In the experiments, different combinations were tested as parameters for the surface response the two types of microorganisms and iron. The results showed that there was a decrease in the initial concentration in all the combinations of which the best result was presented by *Bacillus thuringiensis* with an average degradation rate of 82%.

**Keywords:** Bioremediation. *Pseudomonas fluorescens*. *Bacillus thuringiensis*.

1 Aluno do curso Técnico em Química pela Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC), Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: danielspohr13@gmail.com

2 Aluno do curso Técnico em Química pela Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC), Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: eduardo.cirio@hotmail.com

3 Pós-doutora pelo Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Espanha, doutora em Engenharia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, mestre em Físico-química pela UFRGS, licenciada em Química pela Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil. Professora do Instituto de Química da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. doutorado E-mail: tania.pizzolato@ufrgs.br

4 Licenciada em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. Professora na Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC), Novo Hamburgo, RS. E-mail: carlar@liberato.com.br

## 1 Introdução

Os contaminantes emergentes (CE) são compostos normalmente utilizados no cotidiano das pessoas e na sua maioria não apresentam dados ecotoxicológicos. Segundo a EPAUS (*Environmental Protection Agency - United States*), os contaminantes emergentes são novos produtos químicos, sem regulamentação jurídica, cujo impacto ao ambiente e à saúde humana pouco se conhece (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011). A presença de CE em ambientes aquáticos está se tornando uma grande preocupação mundial, principalmente, pela escassez de água, gerando discussões que visam à busca de soluções (PETROVIC *et al.*, 2004.). Alguns CE podem ser recalcitrantes no meio aquático, além disso, as taxas de remoção nas estações de tratamento de efluentes urbanos não são suficientes para superar as altas taxas de introdução desses compostos no ambiente, sendo que a fração que alcança o ambiente acaba sendo responsável pela persistência e efeitos maléficos dos mesmos. A desregulação endócrina pode ser desencadeada por substâncias capazes de mimetizar hormônios endógenos, ou seja, ligam-se aos receptores estrogênicos endógenos e desenvolvem determinadas ações que não tenham sido comandadas pelo próprio organismo. Interferem diretamente na homeostasia que é fundamental para a manutenção do equilíbrio nos organismos vivos (YING; KOOKANA; RU, 2002; FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Além disso, a poluição dos corpos hídricos vem aumentando, devido ao lançamento em efluentes, esgoto sanitário e à disposição inadequada de resíduos sólidos (FOLMAR *et al.*, 2000). Segundo Daniel (2011), esse fato é de grande preocupação, pois existem inúmeros riscos à saúde causados por poluentes bioativos, compostos químicos orgânicos persistentes e outros compostos que podem estar presentes na água.

Os estrógenos podem ser encontrado em alimentos de origem animal, em agrotóxicos, em produtos veterinários, pílulas de reposição

hormonal e principalmente em anticoncepcionais (DAY; HAWKINS, 1999). Eles são excretados através das fezes e urina. Esses compostos são liberados nos esgotos, chegam às ETE's (Estações de Tratamento de Efluentes) e, depois, são despejados nos corpos hídricos que são geralmente as fontes de captação de água das ETA's (Estações de Tratamento de Água).

De um modo geral, as concentrações desses compostos nos corpos hídricos, são muito baixas (traços e ultra traços) (BILA; DEZOTTI, 2007). No entanto, com o crescimento populacional e o constante aumento do consumo de hormônios, a presença deles poderá aumentar, atuando diretamente na fauna e flora que entra em contato (BAYNES *et al.*, 2012). No Brasil, há um estudo realizado na região de Campinas, sobre o nível de contaminação da água potável em relação aos hormônios, e o resultado foi preocupante, apresentando níveis elevados de hormônios estradiol, etinilestradiol e progesterona (SIMIONATO, 2006). Também vale citar o trabalho realizado por Kolpin *et al.* (2002), no qual determinaram a presença de hormônios em água potável, com níveis na faixa de  $0,073\mu\text{g L}^{-1}$ . É importante salientar que, segundo estudos de Machado (2010),  $0,05\mu\text{g L}^{-1}$  já é uma quantidade suficiente para causar alterações nos seres vivos.

Dentre os tratamentos com bons resultados para a degradação desses compostos, podem-se citar os Processos Avançados de Oxidação (POAs) que incluem a ozonização,  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  e fotocatalise. Esses processos exigem investimento inicial alto, o que impede avanços quanto à implantação no Brasil (LOCATELLI, 2011). Além dessas opções, existe a técnica de biorremediação, que é uma alternativa de baixo custo e de menor impacto ambiental, que consiste em processos de tratamento que utilizam organismos como bactérias, fungos ou vegetais para reduzir, modificar e eliminar compostos orgânicos como o estrogênio (VILELA, 2012). Desse modo, seriam introduzidos microrganismos no

tratamento da água que eliminariam ou, pelo menos, reduziriam consideravelmente a concentração dos hormônios. Dentre as bactérias que são amplamente difundidas no ambiente e que possuem a capacidade de degradar compostos orgânicos, estão: a *Pseudomonas fluorescens* e a *Bacillus thuringiensis* (UPADHYAY; SRIVASTAVA, 2010). A *Pseudomonas fluorescens* é encontrada facilmente no solo, e a *Bacillus thuringiensis*, além de também estar presente no solo, pode ser encontrada em vegetais (BRASIL, 2010).

Visando melhorar a eficiência do tratamento, uma alternativa é a utilização da bioestimulação no processo que, nada mais, é do que a adição de nutrientes para aumentar a atividade microbiana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Dessa forma, o sulfato ferroso por ser um sal amplamente difundido e que tem a capacidade de estimular a ação das bactérias, agindo como um bioestimulante, o que foi proposto como alternativa neste trabalho. O ferro age como nutriente adicional, para o desenvolvimento dos microrganismos, podendo, assim, aumentar suas taxas de degradação (FAVERA, 2008).

A implantação de um sistema como esse seria de suma importância, uma vez que, promover a degradação de estrógenos, presentes no meio ambiente, é de grande importância para evitar desequilíbrios no ecossistema.

Vários estudos realizados mostram que o contato com esse tipo de substância está ligado a grandes impactos ambientais. Por exemplo, há inúmeros casos de animais aquáticos e pássaros que acabam tendo seu sistema endócrino alterado, devido à exposição a esses compostos, como, por exemplo, diminuição da ovulação e da reprodução (BILA; DEZOTTI, 2007).

O presente estudo tem por objetivo avaliar a potencialidade da atualização de microrganismos, para a degradação de estrógenos, especificamente do 17 $\alpha$ -etilnestradiol e da drospirenona, que são estrógenos sintéticos amplamente utilizados em contraceptivos.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Preparo das soluções

As soluções padrões 1 e 2, contendo estradiol e acetato de noretisterona na solução 1 e drospirenona e etinilestradiol na solução 2, na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 60 mg L<sup>-1</sup> e 0,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, foram preparadas no Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS (Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Para o preparo da solução padrão 1, utilizaram-se 5 comprimidos do anticoncepcional *Suprelle*<sup>®</sup> que, em cada comprimido, possui 1,0 mg de estradiol e 0,5 mg de acetato de noretisterona; já o padrão 2 foi feito com 2 comprimidos do anticoncepcional *Elaniciclo*<sup>®</sup> que possui 3 mg de drospirenona e 0,03 mg de etinilestradiol por comprimido. A água peptonada foi preparada, utilizando 1,0 g de peptona de caseína em 1000 mL de água ultrapura. A solução de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) 0,03% foi preparada, pesando-se 0,05g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e dissolvido, em água ultra pura, em balão volumétrico de 100 mL.

### 2.2 Planejamento fatorial

Para realização de todos os experimentos, tanto os do comportamento dos microrganismos, quanto os simulando ambiente real, utilizou-se um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, em que os experimentos são organizados com todas as possíveis combinações de níveis de fatores (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

### 2.3 Comportamento dos microrganismos e experimentos, simulando ambiente real

Visando um melhor entendimento do metabolismo das bactérias em estudo, realizaram-se ensaios para avaliar o comportamento dos microrganismos frente aos estradiol, acetato de noretisterona, drospirenona e etinilestradiol, bem como o comportamento de degradação dos mesmos. Para isso, um grupo de experimentos permaneceu oito (8) horas incubado, e

outro grupo permaneceu dezesseis (16) horas.

Após a definição do comportamento dos microrganismos frente aos estrógenos, fez-se uma análise, visando simular o tempo real em que o microrganismo ficaria em uma lagoa aerada de uma estação de tratamento de esgoto. Para isso, foi determinado um novo tempo de incubação de 72 horas, pois o tempo de permanência do esgoto na lagoa aerada é de 2 a 4 dias (VON SPERLING, 1996). Nessa etapa, foi avaliado o ferro como bioestimulante. A concentração da solução de hormônios utilizada, levou em consideração os dados obtidos por Dallegrave (2012), em amostras de efluente urbano não tratada.

Para testar as diferentes ações dos fatores, os sistemas foram utilizados em dois padrões, cada um possuindo um tipo de estrógeno diferente, tendo-se o padrão 1 com estradiol ( $C_{18}H_{24}O_2$ ) e acetato de noretisterona ( $C_{22}H_{28}O_3$ ) e o padrão 2 com drospirenona ( $C_{24}H_{30}O_3$ ) e etinilestradiol ( $C_{20}H_{24}O_2$ ).

## 2.4 Preparo dos experimentos

Os experimentos foram numerados, seguindo a seguinte simbologia:

-1Px = Padrão 1, experimento x; (onde x segue a numeração de 1 a 8).

-2Py = Padrão 2, experimento y; (onde y segue a numeração de 1 a 8).

Os experimentos da análise do comportamento dos microrganismos também foram identificados com o sufixo “\_A1”, para os incubados 8 horas, “\_B1”, para os incubados por 16 horas e “\_0h”, para os que não tiveram incubação e foram usados como branco.

No preparo dos experimentos, transferiu-se 20 mL da água peptonada para cada erlenmeyer. Nos experimentos com ferro, adicionou-se 0,26 mL da solução de sulfato ferroso. Após, todos os experimentos foram para a autoclave para serem esterilizados a 121 °C, durante 15 min. A seguir, os erlenmeyers foram transferidos para uma capela de fluxo laminar, para o término da preparação dos experimentos.

Os microrganismos foram corrigidos para 0,5 McFarland. Esse método baseia-se na comparação de um padrão de turvação de uma amostra com o cultivo do microrganismo, através de medida em espectrofotômetro VIS Femto 600 plus, no comprimento de onda 625 nm. Após esse ajuste, foram adicionados 3,0 mL do padrão 1 e 2,5 mL do padrão 2, seguido pela adição de 0,2 mL de cada microrganismo. Após, os erlenmeyers foram incubados a 23 °C, cada grupo com seu tempo de incubação. Passado o tempo de incubação, foi visível a formação de turbidez, devido ao desenvolvimento da biomassa, o que caracteriza o crescimento dos microrganismos. As amostras foram filtradas com membranas de nylon (já estéreis) de 13 mm de diâmetro e 0,2 µm de poro, para proceder às análises por UV-Vis.

## 2.5 Análise instrumental

### 2.5.1 Análise por espectroscopia eletrônica

Para realizar a análise da concentração dos estrógenos por espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV), utilizou-se um espectrofotômetro da marca Varian, com velocidade de varredura de 500 nm/min na faixa de 200 a 800 nm, com cubetas de quartzo. O branco foi água ultrapura, e o espectro eletrônico de todas as amostras foram obtidos nessas condições. Todos os experimentos foram realizados em duplicata (DALLEGRAVE, 2012).

### 2.5.2 Análise por cromatografia à líquido de alta eficiência com detector de UV-Vis

As soluções, contendo etinilestradiol (padrão 2), foram analisadas por CLAE-UV (cromatografia a líquido de ultra-alta *performance* com detector de ultravioleta), utilizando coluna Acclaim C18 (5 µm × 4.6 mm × 250 mm), pré-coluna: C18 (5 µm × 4.6 mm × 10 mm), temperatura da coluna de 30 °C, fase móvel no modo isocrático composta de acetonitrila (55%):(45%) e água ultrapura. O volume de injeção foi de 20 µL, com tempo de análise de 15 minutos, utilizando o fluxo da fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup>. O comprimento de onda do detector foi de 230 nm.

Os experimentos, contendo os fatores, também foram analisados por CLAE-UV, nas mesmas condições, porém com o comprimento de onda do detector de 254 nm (DALLEGRAVE, 2012).

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Análise por espectroscopia eletrônica

Inicialmente, foram traçados espectros eletrônicos das amostras, a fim de avaliar a possibilidade de realizar o controle, utilizando

esta técnica. A análise dos espectros permitiu verificar que, tanto os padrões em estudo, quanto a água peptonada, possuem banda de absorção característica em torno de 250 nm. O fato de a banda de absorção, característica para as três soluções ser sobreposta, não permitiu avaliar o efeito dos microrganismos sobre os compostos de interesse, pois a variação na absorbância no comprimento de onda de máxima absorção está influenciada, tanto pelos compostos, como pela peptona, como mostra a figura a seguir:

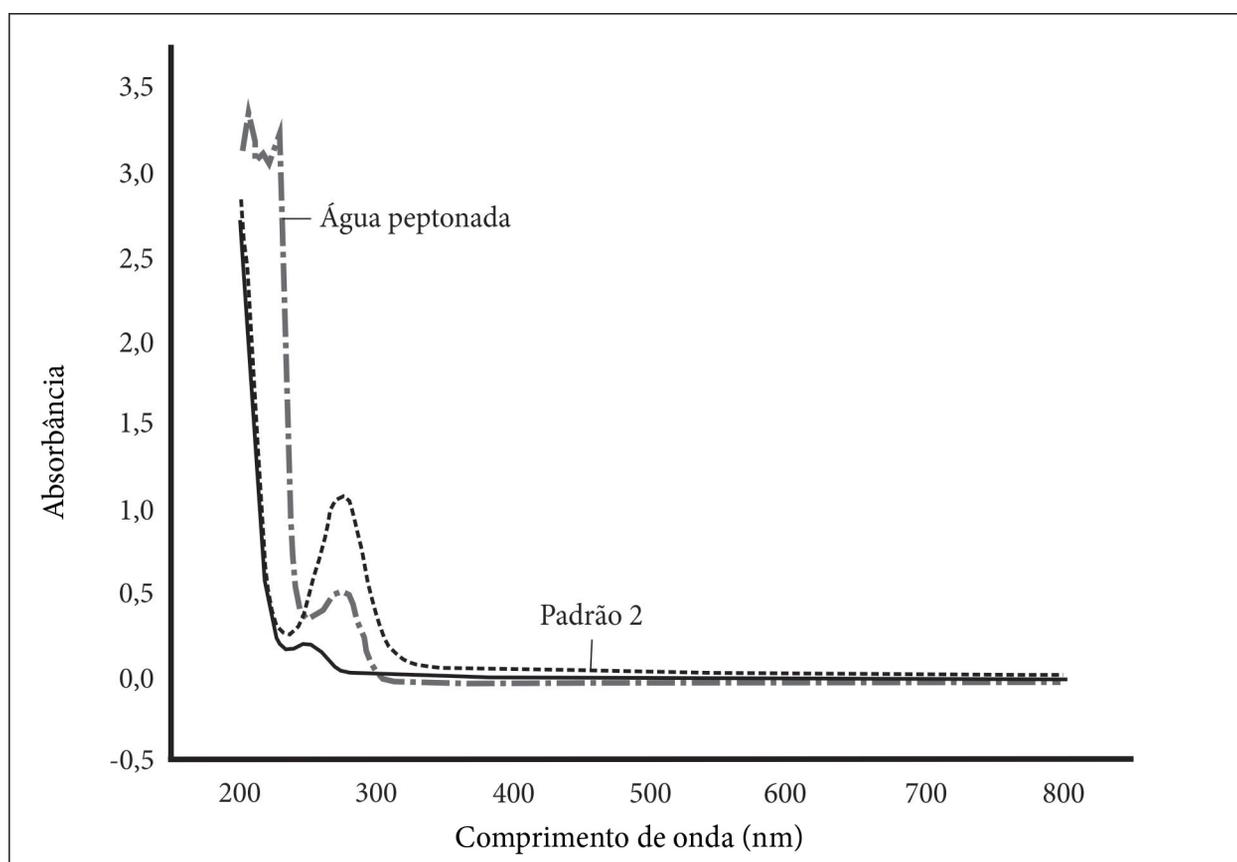


Figura 1 - Espectro eletrônico na faixa de 200 a 800 nm das soluções aquosas do padrão 1, padrão 2 e água peptonada  
Fonte: Os autores (2013).

Dessa forma, foi necessário utilizar outra técnica que permitisse separar os constituintes da amostra, para verificar o efeito dos microrganismos. Portanto, as amostras passaram a ser analisadas por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detector de UV-Vis, no comprimento de onda de 230 nm,

que corresponde a uma absorção adequada para todas as soluções a serem estudadas.

#### 3.2 Cromatografia a líquido

A análise por cromatografia a líquido permitiu a separação de todos os componentes

da amostra, obtendo-se, para cada um, o tempo de retenção e as respectivas áreas dos picos. A figura 2 apresenta o cromatograma obtido para a solução 1 que contém estradiol e noretisterona, e a figura 2, o cromatograma da solução 2 que contém etinilestradiol e drospirenona.

A partir dos resultados dos cromatogramas, observa-se que a noretisterona não apresenta resposta, não sendo possível avaliar a degradação da mesma. Já os hormônios, estrona, etinilestradiol e drospirenona apresentam boa resposta, sendo possível avaliar a degradação dos mesmos por essa técnica instrumental.

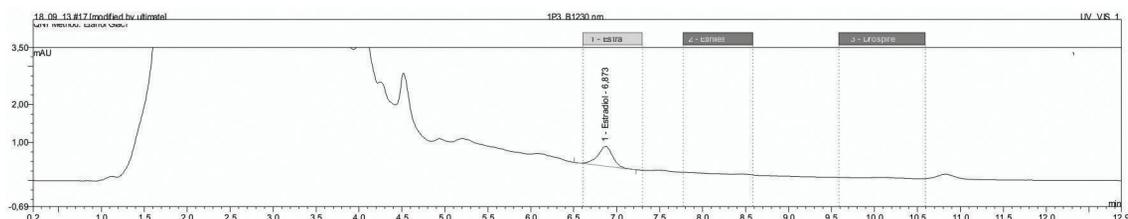


Figura 2 - Cromatograma da solução aquosa, contendo estradiol e noretisterona. Detector em 230 nm.  
Fonte: Os autores (2013).

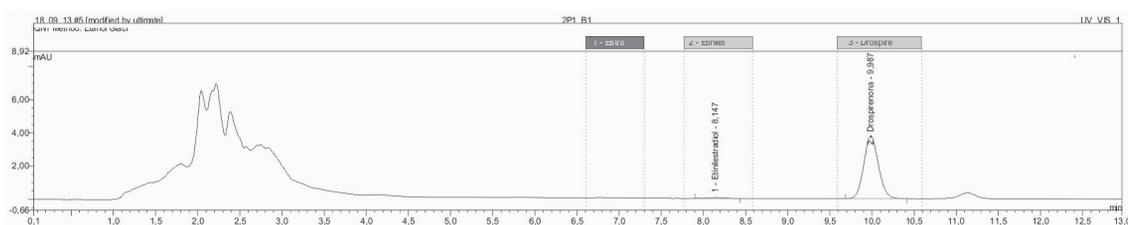


Figura 3 - Cromatograma da solução aquosa, contendo etinilestradiol e drospirenona.  
Detector em 230 nm.  
Fonte: Os autores (2013).

A degradação desses compostos foi acompanhada pela área dos picos de cada um. Os dados de tempo de retenção e área, para os experimentos realizados, são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Resultado da análise dos experimentos, contendo a solução padrão 1

Experimento	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)
Unidade:	min	mAU min
Estrógeno:	Estradiol	Estradiol
Solução padrão 1	6,88	0,0557
Solução padrão 1	6,87	0,0187
Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i>	6,84	0,0183
Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i>	6,81	0,0030
Solução padrão 1 + <i>B. thuringiensis</i>	6,82	0,0310
Solução padrão 1 + <i>B. thuringiensis</i>	6,80	0,0310

Continuação...

...continuação

Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i>	6,80	0,0248
Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i>	6,79	0,0248
Solução padrão 1 + Sulfato ferroso	6,87	0,0391
Solução padrão 1 + Sulfato ferroso	6,86	0,0392
Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i> + Sulfato ferroso	6,87	0,0389
Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i> + Sulfato ferroso	6,85	0,0325
Solução padrão 1 + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	6,83	0,0386
Solução padrão 1 + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	6,81	0,0371
Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	6,86	0,0409
Solução padrão 1 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	6,84	0,0397

Fonte: Os autores (2013).

Tabela 2 - Resultado da análise dos experimentos, contendo a solução padrão 2

Experimento	Retenção	Área	Retenção	Área
Unidade:	(min)	(mAU min)	(min)	(mAU min)
Estrógeno:	Etinilestradiol	Etinilestradiol	Drospirenona	Drospirenona
Solução padrão 2	8,15	0,0078	9,99	0,060
Solução padrão 2	8,137	0,0075	9,98	0,040
Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + <i>B. thuringiensis</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + <i>B. thuringiensis</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i> + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	9,99	0,042

Continuação...

...continuação

Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i> + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	9,97	0,034
Solução padrão 2 + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	9,97	0,018
Solução padrão 2 + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	9,97	0,018
Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	9,99	0,012
Solução padrão 2 + <i>P. fluorescens</i> + <i>B. thuringiensis</i> + Sulfato ferroso	n.a.	n.a.	9,97	0,009

Fonte: Os autores (2013).

### 3.3 Comportamento dos microrganismos

Os primeiros experimentos analisados foram os do comportamento dos microrganismos. Obteve-se o percentual de degradação de cada um dos fatores sobre cada hormônio. Na figura 4, encontram-se os resultados de degradação para o estradiol, na figura 5, para o etinilestradiol e, na figura 6, para a drospirenona.

Os gráficos estão organizados na forma de cubo que permite analisar a interação entre todos os experimentos. Os sinais de positivo e negativo indicam a presença (+) ou ausência (-) dos microrganismos. Os círculos representam os experimentos contendo ferro, enquanto os quadrados indicam os que não o contém.

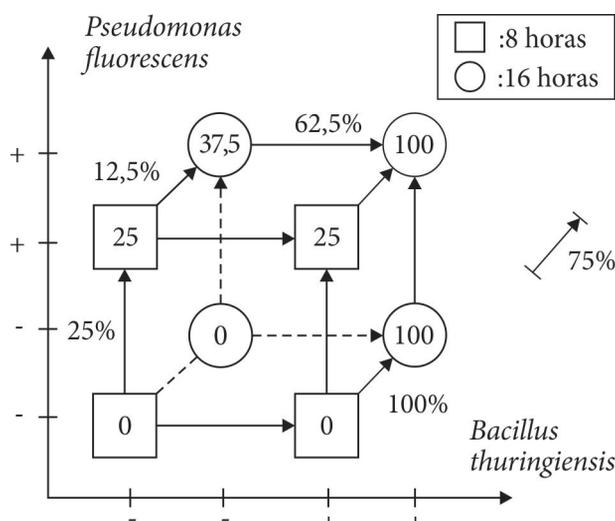


Figura 5 - Degradação do etinilestradiol  
Fonte: Os autores (2013).

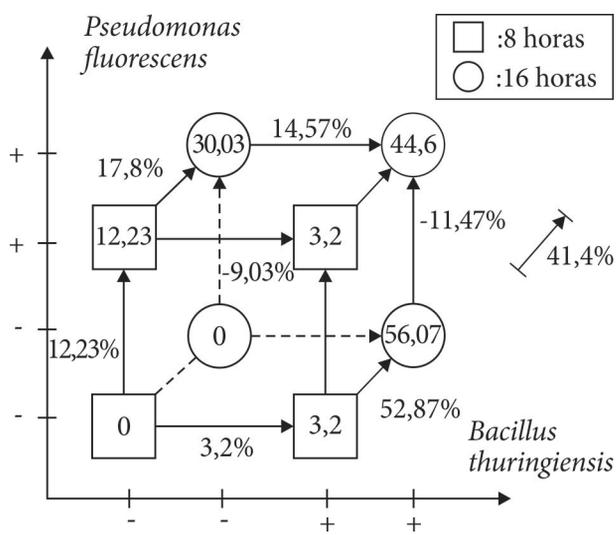


Figura 4 - Degradação do estradiol  
Fonte: Os autores (2013).

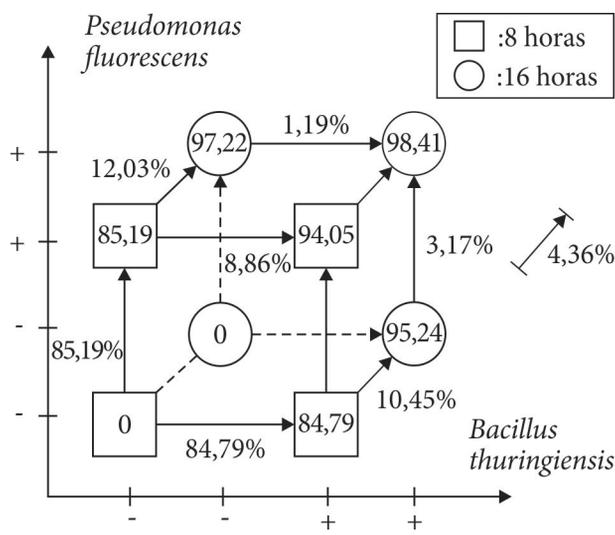


Figura 6 - Degradação da drospirenona  
Fonte: Os autores (2013).

A partir da análise dos gráficos de degradação das substâncias, foi possível verificar que os microrganismos degradam os hormônios e foi possível analisar o comportamento dos microrganismos frente aos hormônios estradiol, etinilestradiol e drospirenona. Percebeu-se que, no tempo de incubação de 8 horas, a melhor combinação de fatores sempre foi aquela relativa aos experimentos, contendo o microrganismo *Pseudomonas fluorescens*, enquanto que o microrganismo *Bacillus thuringiensis* apresentou pouca capacidade de degradação. Já nos experimentos com tempo de incubação de 16 horas, a melhor combinação de fatores foram os experimentos, contendo o microrganismo *Bacillus*. Com isso, conclui-se que o *Bacillus thuringiensis* necessita de um certo tempo até começar a degradação, porém, quando começa, é muito mais efetivo. Já o gênero *Pseudomonas*, logo começa com a degradação, porém à medida que passa o tempo, a taxa de degradação vai diminuindo até estabilizar.

Os experimentos, contendo ambos os microrganismos, não apresentaram resultados esperados, podendo-se concluir que os microrganismos interagem de maneira antagônica. Levando-se em consideração essas características dos microrganismos, conclui-se que a melhor combinação de fatores foi a dos experimentos, contendo o padrão com o microrganismo *Bacillus thuringiensis* em um tempo de incubação de 16 horas.

### 3.4 Amostras simulando ambiente real

As amostras, simulando situação real, também foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e os resultados, aplicados ao DOE (*Design of Experiments*), estão expressos nas figuras 7, para o estradiol; 8 para o etinilestradiol e 9 para a drospirenona.

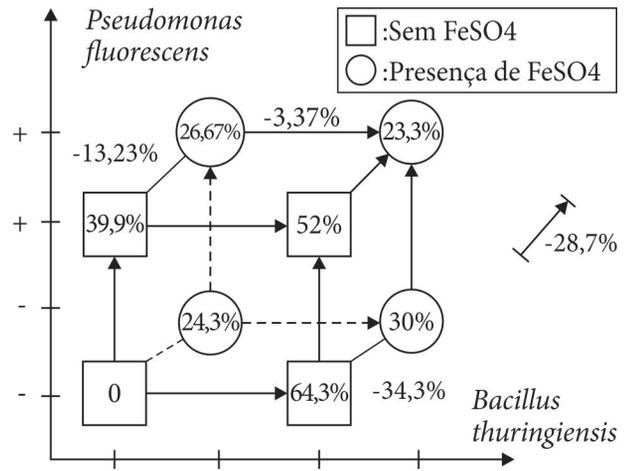


Figura 7 - Simulação de degradação para o estradiol  
Fonte: Os autores (2013)

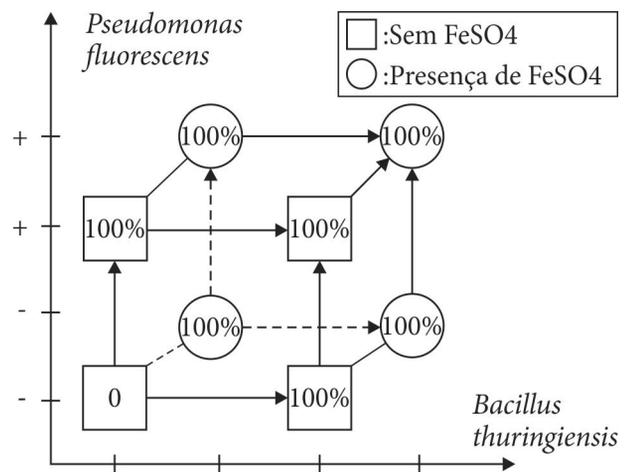


Figura 8 - Simulação de degradação para o etinilestradiol  
Fonte: Os autores (2013).

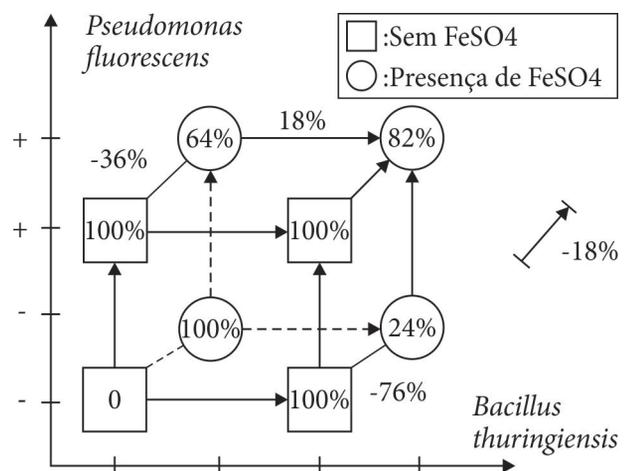


Figura 9 - Simulação de degradação para a drospirenona  
Fonte: Os autores (2013).

Fazendo uma análise dos mesmos, pode-se verificar que todos os fatores apresentam degradação dos estrógenos. O *Bacillus* apresenta uma taxa de degradação mais expressiva. Como se esperava, devido às análises sobre o comportamento dos microrganismos, a taxa de degradação aumentou com o aumento do tempo de incubação.

Ao analisar os dados, percebe-se que são semelhantes para os microrganismos com uma taxa ligeiramente maior para o *B. thuringiensis*. Nos experimentos que continham apenas o ferro, houve degradação, já nos experimentos que continham ferro combinado com algum microrganismo, o ferro inibiu a ação do mesmo, fazendo com que a taxa de degradação fosse menor do que a do microrganismo sem a presença dele. Esse comportamento pode ser atribuído à ocorrência da reação Fenton, pois o ferro se estabiliza na forma de  $Fe^{3+}$ , liberando oxigênio nascente, que é oxidante, por esse motivo ele sozinho poderá degradar os compostos (MARINHO, 2012). Observando os resultados dos fatores sob cada hormônio, também se observa a eficiência do sistema em relação ao etinilestradiol, que é o hormônio encontrado em maior concentração no meio ambiente e o que mais causa os problemas citados anteriormente, sendo que, mesmo com o interferente do ferro, houve total degradação. Levando em consideração os resultados, concluiu-se que o melhor sistema, que degrada 100% do etinilestradiol, 100% da drospirenona e 89,33% do estradiol, em 72 h, é o experimento contendo somente o *B. thuringiensis*.

#### 4 Custo de implantação

Para ter uma avaliação do custo da implantação do sistema proposto, simulando a viabilidade econômica do mesmo, fez-se o levantamento de todos os custos envolvidos para sua aplicação, sendo eles as cepas e transportes dos microrganismos e o meio de cultivo caldo TSB (utilizado para ativação das cepas dos microrganismos), descritos na tabela a seguir.

Tabela 3 - Custo de implantação

Gastos	Valor
Cepas dos microrganismos	R\$ 80,00
Transporte dos microrganismos	R\$ 412,92
Caldo TSB	R\$ 77,82
Preço total:	R\$ 570,74

Fonte: Os autores (2013).

As análises para controle de qualidade do processo que deverão ser feitas não são as mesmas realizadas no projeto, porque serão feitas com amostras reais, com uma série de interferentes que necessitam de uma metodologia analítica específica e de outro equipamento. Os custos para manter o funcionamento e o controle do sistema são necessários em todos os processos que apresentam a finalidade de degradar estrógenos, ou seja, sistemas que usam o processo de ozonolização ou fotocálise também terão esses custos. Então, o que determina a viabilidade econômica do sistema proposto é o seu custo de implantação que, no caso da utilização dos microrganismos, é baixo.

#### 5 Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer que o processo proposto para degradação do estrógenos se mostrou eficiente, uma vez que o melhor resultado teve uma taxa média de degradação de 82%. Em contrapartida, a hipótese de que o ferro atua como bioestimulante foi negada, pelo contrário, o ferro atuou inibindo a ação dos microrganismos.

Do ponto de vista econômico, trata-se de um sistema economicamente viável, por ter um baixo custo de implantação e por não ser necessária a criação de um novo sistema (como tanques, válvulas e equipamentos industriais), pois se utilizaria a lagoa aerada das estações de tratamento de esgoto.

Com este estudo, espera-se contribuir com um mundo melhor para gerações futuras, evitando-se doenças e garantindo-se melhor qualidade de vida.

## Referências

- BAYNES, A. *et al.* Additional treatment of wastewater reduces endocrine disruption in wild fish: a comparative study of tertiary and advanced treatments. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 5565-5573. 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003. p. 1 – 99.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio Ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/qn/30n3/26.pdf>>. Acesso em: 8 jun. 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 3.864 de 19/08/10**. Diário Oficial da União, Brasília, 23 ago. 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8b18280047458ada946bd43fbc4c6735/B01.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 7 jun. 2013.
- DALLEGRAVE, A. **Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS**. 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/66440>>. Acesso em: 6 jun. 2013.
- DANIEL, L. A. **Oxidação de estrona e estradiol com ozônio e cloro nas águas de abastecimento**. 2011. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/25001/oxidacao-de-estrona-e-estradiol-com-ozonio-e-cloro-nas-aguas-de-abastecimento/>>. Acesso em: 6 jun. 2013.
- DAY, C.; HAWKINS, M; **O estrogênio através do ciclo da vida**. 1999. Disponível em: <<http://www.nossofuturoroubado.com.br/old/ciclo.htm>>. Acesso em: 7 jun. 2013.
- DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442-448, nov. 2011.
- FAVERA, D. H. C. **Sites contaminados por hidrocarbonetos: principais técnicas de remediação e exemplo de aplicação**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- FILHO, R. W. R.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, n. 29, p. 817-822, 2006.
- FOLMAR, L. C. *et al.* Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1-2, p. 77-78, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X99000764>>. Acesso em: 8 jun. 2013.
- KOLPIN, D. W. *et al.* Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999–2000 : a national reconnaissance. **Environmental Science Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es011055j>>. Acesso em: 28 jun. 2013.
- LOCATELLI, M. A. F. **Processos oxidativos avançados (POA) no tratamento in situ de corpos de água superficiais**. 2011. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/pomarurbano/files/2011/10/Dr-marco-antonio-fernandes-locatelli.pdf>>. Acesso em: 7 jun. 2013.
- MACHADO, K. S.; **Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do Alto Iguaçu, região metropolitana de Curitiba - PR**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/26942/DISSERTACAO%20KARINA%20VERSAO%20FINAL.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 7 jun. 2013.
- MARINHO, B. A. **Estudo da potencialidade da fotocatalise heterogênea e dos processos**

**fenton para degradação de micropoluentes em água residuárias (esgoto tratado).** 2012. Disponível em: < <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/30211>>. Acesso em: 8 jun. 2013.

PETROVIC, M. et al. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 3, p. 549-562, 2004.

SIMIONATO, M. **Estudo acha hormônio sexual em água na região de Campinas.** 2006. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u129198.shtml> >. Acesso em: 7 jun. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre : Artmed, 2005. 894 p.

UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Evaluation of multiple plant growth promoting traits of an

isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 6, p. 601-609, 2010. Disponível em: <[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/9077/1/IJEB%2048\(6\)%20601-609.pdf?origin=publication\\_detail](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/9077/1/IJEB%2048(6)%20601-609.pdf?origin=publication_detail)>. Acesso em: 28 jun. 2014.

VILELA, C. L. S. **Biorremediação: a melhor alternativa para o tratamento de efluentes contaminados por hormônios.** 2012. Disponível em: <<http://www.microbiologia.ufrj.br/informativo/micromundo/434-biorremediacao-a-melhor-alternativa-para-o-tratamento-de-efluentes-contaminados-por-hormonios>>. Acesso em: 7 jun. 2014.

VON SPERLING, M. **Lagoas de estabilização: princípios do tratamento de águas residuárias.** Belo Horizonte: UFMG, 1996. 246 p.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545-551, dec. 2002.