

## II-015 - FICORREMEDIAÇÃO DE 17-ALFA ETINILESTRADIOL PELA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* IMOBILIZADA EM CÁPSULAS DE ALGINATO

### **Ericka Cardoso de Gois Ferreira<sup>(1)</sup>**

Gestora Ambiental pelo Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca (CEFET/RJ). Mestranda em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Analista ambiental do Instituto Estadual do Ambiente (INEA).

### **Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira<sup>(1)</sup>**

Professora adjunta do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Membro do Grupo de Pesquisa BIOTEMA (@gpbiotema), Docente do curso de Doutorado de Engenharia Ambiental (DEAMB) e do Mestrado em Engenharia Ambiental (PEAMB) - UERJ

### **André Luís de Sá Salomão<sup>(1)</sup>**

Professor adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA). Docente e coordenador do curso de Doutorado de Engenharia Ambiental (DEAMB). Grupo de Pesquisa BIOTEMA (@gpbiotema) do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DESMA-UERJ)

### **Marcia Marques Gomes<sup>(1)</sup>**

Professora titular do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Docente do curso de Doutorado de Engenharia Ambiental (DEAMB) e do Mestrado em Engenharia Ambiental (PEAMB) - UERJ

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua São Francisco Xavier, 524, Pavilhão Reitor João Lyra Filho, 5º andar – sala 5002 – bloco A, Campus Maracanã – UERJ, CEP 20550-900 – Brasil – Tel: (21) 98500-6786 – E-mail: erickagois@gmail.com

## **RESUMO**

Os micropoluentes emergentes estão cada vez mais presentes nos efluentes domésticos. No entanto, como estes não são suficientemente removidos pelas tecnologias convencionais de tratamento de efluentes, eles geralmente são encontrados em baixas concentrações em matrizes aquáticas (ng/L), o que pode causar inúmeros efeitos perturbadores nos organismos expostos, incluindo humanos. Dentre estes, destaca-se o hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), amplamente utilizado na indústria farmacêutica, principalmente em contraceptivos e terapias de reposição hormonal. Portanto, o uso de espécies selecionadas de microalgas tem sido estudado e aplicado no tratamento de efluentes como potencialmente eficaz na fitorremediação (remoção ou biodegradação) de contaminantes-alvo, como hormônios femininos sintéticos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de fitorremediação da microalga *Chlorella vulgaris*, imobilizada em cápsulas de alginato de sódio, na remoção/biodegradação do hormônio feminino sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2). Inicialmente, foi realizado o encapsulamento da microalga com alginato de sódio para avaliar a capacidade da microalga permanecer viva e ser liberada lentamente no meio líquido após o processo de encapsulamento. Após o processo de encapsulamento, o crescimento das células da microalga foi acompanhado ao longo de 4 meses por contagem celular em câmara de Neubauer e foi verificado aumento no número de células, significando que a microalga permaneceu viva e houve aumento no número de células. Na segunda etapa, foram realizados bioensaios de fitorremediação, onde as microalgas encapsuladas foram então expostas a 50 $\mu$ g/L de EE2 em água mineral por 96h. Paralelamente, foram conduzidos bioensaios controle com microalgas livres em água mineral (controle negativo) e outro com apenas EE2 em água mineral (controle positivo). Os bioensaios foram monitorados por contagem de células e concentração de EE2 por cromatografia líquida. Os resultados estão sendo analisados e serão apresentados no artigo completo, onde se espera uma eficiência entre 60 e 70% de redução na concentração de EE2 na água.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alginato de sódio, hormônio sintético, encapsulamento microalgas, 17-alfa etinilestradiol.

## INTRODUÇÃO

Os micropoluentes ambientais são caracterizados por diversas substâncias químicas que são encontradas em produtos de higiene pessoal e limpeza; defensivos agrícolas; produtos cosméticos; produtos farmacêuticos; plastificantes e compostos naturais. Eles podem causar inúmeros impactos tanto ao meio ambiente quanto aos seres vivos e o principal meio de veiculação destes são os efluentes sanitários, sendo domésticos ou industriais, acarretando também problemas às águas subterrâneas e superficiais (AVILA et al., 2014).

Dentre os micropoluentes, os hormônios estão presentes cada vez mais nos esgotos que, ao serem lançados em corpos receptores sem um tratamento adequado podem dar origem a um problema ambiental relevante (SALOMÃO; MARQUES, 2015). Dentre os vários efeitos ocasionados pelos hormônios em ecossistemas aquáticos, pode-se citar a desregulação endócrina que interfere no sistema endócrino de animais e humanos, além de resultar em doenças, como o câncer, e afetar o crescimento e a reprodução (BILA; DEZOTTI, 2007; SALOMÃO; MARQUES, 2015).

Há inúmeras tecnologias que são apropriadas para eliminar os desreguladores endócrinos dos corpos d'água, dentre elas, a fitorremediação, ou seja, o uso de metodologias de tratamento a partir da aplicação e o cultivo das microalgas (CRAGGS et al., 2012). O uso desta tecnologia para o tratamento de efluentes e remoção/biodegradação de micropoluentes surge como alternativa, ainda em fase de estudos, desenvolvimento e aplicação, e tem se mostrado eficiente na remoção/biodegradação de hormônios estrogênicos (SOLE; MATAMOROS, 2016). Configura-se como um método de baixo custo no que diz respeito à infraestrutura e operação tem também potencial de remoção de nutrientes e hormônios da matriz aquosa, uma vez que estes são incorporados na produção de biomassa algal. Além da capacidade de promover um efluente com uma elevada qualidade de tratamento e posteriormente, a biomassa algal pode ser utilizada para o uso como biocombustível (CRAGGS et al., 2012).

As metodologias de tratamento biológico de efluentes tiveram um aumento significativo nos últimos anos, tendo em vista suas características, como alta eficiência de tratamento, o fato de ser um tratamento ecológico, de baixo custo e baixa produção de materiais adicionais. Essas tecnologias de natureza biológica começaram a ser desenvolvidas para realizar o tratamento de efluentes domésticos e industriais, também são utilizadas como principais métodos de tratamento ou devem ser utilizadas em conjunto com outras formas de tratamento para atingir uma eficiência interessante (GUO et al., 2021; JAAFARI et al., 2020).

Mais recentemente, com o objetivo de aprimorar do processo de remoção de micropoluentes dos esgotos, a imobilização de bactérias e microalgas em cápsulas de alginato de sódio têm se mostrado bastante eficiente na remoção de alguns poluentes orgânicos e metais pesados da matriz aquosa (de-BASHAN e BASHAN, 2010).

A imobilização de microrganismos com o uso de polímeros, principalmente o alginato de sódio, vem ganhando cada vez mais visibilidade. O alginato de sódio é um polissacarídeo, polímero hidrofílico natural, biodegradável, obtido a partir de bactérias ou algas marrons, que se caracteriza pela biodegradabilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade, desempenho não espessante e gelificante. Este polímero é comumente utilizado no encapsulamento de microalgas, pois tem grande capacidade de formar pequenas partículas de gel quando na presença de cátions bivalentes, como o  $\text{Ca}^{2+}$ . (VOO e outros, 2011).

A utilização de microalgas imobilizadas (ou encapsuladas) tem sido extensivamente estudada e utilizada nos últimos tempos no tratamento de efluentes de diversas atividades, como a aquicultura. Alguns estudos mostram que as microalgas imobilizadas têm várias vantagens, como a remoção de poluentes, como nutrientes, permitem que as células das algas tenham tolerância a ambientes com toxicidade de metais e alta salinidade (de-Bashan e Bashan, 2010).

## OBJETIVO

Avaliar a capacidade da microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em cápsulas de alginato de sódio na remoção do hormônio 17-alfa etinilestradiol.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e efluentes (LABIFI), situado no campus Maracanã da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

A segunda etapa foi a realização de ensaios com microalgas encapsuladas em alginato de sódio para avaliar a eficiência da ação destas na remoção do hormônio de EE2 do meio aquoso. O pré-cultivo das microalgas foi iniciado entre 3 a 5 dias antes do dia do ensaio, em meio L.C. Oligo. Foi centrifugado 1 litro de microalgas em tubos Falcon a 20°C, por 15 min a 1180 rpm. A partir do sobrenadante, uma suspensão de microalgas foi preparada numa concentração na ordem de  $10^6$  cel/mL.

Para o encapsulamento das microalgas foi utilizada uma solução com 50 ml de *C. vulgaris* ( $10^6$  cel/mL) e 2g de alginato de sódio, mantida em agitação por uma hora. Em seguida, foram feitas as microesferas com auxílio de uma bomba peristáltica, numa vazão de 3 ml/min para que fossem gotejadas as microesferas em solução de cloreto de cálcio. As microesferas foram lavadas com água destiladas e mantidas refrigeradas, até o momento do ensaio, por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata, totalizando 12 amostras e as combinações utilizadas no ensaio foram as seguintes: Alga livre e EE2 (50 µg/L); Água mineral e EE2 (50 µg/L); Água mineral, EE2 (50 µg/L) e microesferas de alginato; e Água mineral, EE2 (50 µg/L) e microesferas de alginato de sódio com algas. A concentração de EE2 foi monitorada por 96 horas por cromatografia em fase líquida, nos tempos 0h, 6h, 24h e 96h.

## RESULTADOS OBTIDOS

Após as primeiras 6 horas de experimento, foi obtida uma redução de 20,81 µg/L da amostra A (contendo apenas algas livres e EE2) equivalente a uma redução de concentração de EE2 de 26,69%, a amostra B (água mineral e EE2) reduziu 11,07 µg/L equivalente a uma redução de 23,91%, a amostra C (cápsulas de alginato, água e EE2) reduziu 16,26 µg/L equivalente a 42,48% e a amostra D (cápsulas de alginato e algas, EE2 e água mineral) reduziu 19,9 µg equivalente a uma redução de 52,47%.

A tabela 1 a seguir mostra a média das concentrações das amostras nos respectivos tempos:

**Tabela 1: Média das concentrações de EE2 nos ensaios ao longo do tempo.**

|     | A (µg/L) | B (µg/L) | C (µg/L) | D (µg/L) |
|-----|----------|----------|----------|----------|
| T0  | 77,96    | 46,29    | 38,28    | 37,93    |
| T6  | 57,15    | 35,22    | 22,02    | 18,03    |
| T24 | 31,52    | 32,68    | 18,94    | 13,11    |
| T96 | 19,80    | 47,98    | 25,67    | 19,4     |

Legenda: A (alga e EE2); B (água mineral e EE2); C (cápsulas de alginato, água mineral e EE2) e D (cápsulas de alginato e algas, EE2 e água mineral).

Após as 24 horas de experimento, ainda foi possível verificar uma degradação significativa da concentração de EE2 nas amostras, sendo verificado uma redução de 59,57% na amostra A, 29,39% na amostra B, 50,52% na amostra C e 65,44% na amostra D. Entretanto, após as 96 horas finais de experimento, a concentração final da amostra A teve uma redução de 58,16 µg equivalente 74,59%, na amostra C houve uma redução de 12,61 µg equivalente a uma redução de 32,94%, na amostra D reduziu 18,53 µg equivalente a uma redução de 48,85%, porém a amostra B teve um comportamento diferente das outras amostras em que houve um aumento de 1,69 µg do valor da concentração inicial equivalente a um aumento de 3,66%.

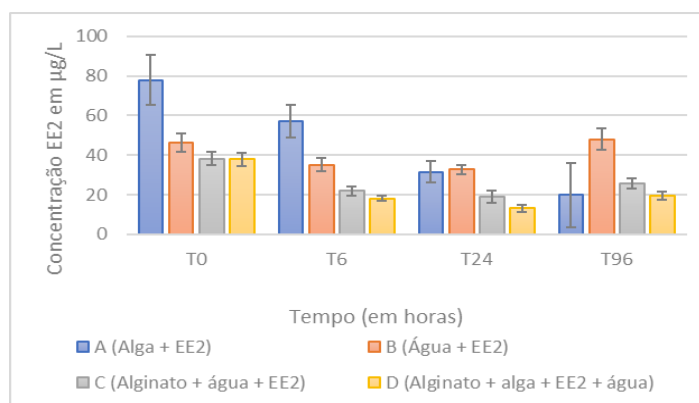
A tabela 2 a seguir apresenta as porcentagens de redução da concentração do hormônio EE2 ao longo dos tempos determinados:

**Tabela 2: Redução de EE2 ao longo do tempo.**

|   | 6 horas | 24 horas | 96 horas |
|---|---------|----------|----------|
| A | 26,69%  | 59,57%   | 74,59%   |
| B | 23,91%  | 29,39%   | -3,66%   |
| C | 42,48%  | 50,52%   | 32,94%   |
| D | 52,47%  | 65,44%   | 48,85%   |

Legenda: A (alga e EE2); B (água mineral e EE2); C (cápsulas de alginato, água mineral e EE2) e D (cápsulas de alginato e algas, EE2 e água mineral).

O gráfico a seguir apresenta a redução da concentração de EE2 em µg/L ao longo do tempo. É possível verificar que a amostra A contendo algas e EE2 houve uma significativa redução da concentração de hormônio nas primeiras 6 horas de experimento em comparação com as outras amostras. Ademais, é possível verificar que após às 96 horas de experimento, a redução total da concentração de hormônio EE2 na amostra A foi de 75%, na amostra B teve um aumento de 4%, na amostra C houve uma redução de 33% e na amostra D reduziu 49%.



**Figura 1: Redução da concentração de EE2 ao longo do tempo (em horas).**

## CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo mostraram que as amostras com algas livres tiveram um melhor resultado no que tange a remoção de EE2 ao longo do tempo, sendo levado em consideração as reduções de concentração nos tempos 6 horas, 24 horas e 96 horas finais, tendo uma porcentagem de redução final de 74,59%; as algas encapsuladas em alginato de sódio tiveram uma eficiência de 48,85% de remoção de EE2 após as 96 horas de experimento e a amostra contendo água e as cápsulas de alginato de sódio também tiveram uma eficiência de remoção do hormônio.

As algas em cápsulas de alginato representam um maior tempo de manutenção dessas células no ambiente. As cápsulas funcionam como uma fonte de microalgas, que pela sua viabilidade, podem seguir o processo de divisão celular e manter a concentração de algas elevadas, garantindo a eficiência de remoção de micropoluentes ambientais em tanques de tratamento terciário por mais tempo.

Pode-se dizer que esta metodologia de encapsulamento pode ser viável para remoção de micropoluentes, sobretudo o hormônio EE2 gerando um aumento na eficiência do processo.

Entretanto, considerando que ainda há poucos estudos relacionados ao encapsulamento de microalgas para serem utilizadas no tratamento de efluentes visando a remoção de micropoluentes será importante mais estudos e pesquisas relacionados a esta tipologia de tratamento objetivando maior rendimento do sistema de tratamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABARGUES, M. R. et al. *Removal and fate of endocrine disruptors chemicals under lab-scale posttreatment stage. Removal assessment using light, oxygen and microalgae*. Bioresource technology, v. 149, p. 142-148, 2013.
2. AVILA, C. et al. 2014. *Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater*. Science of the total environment, v. 470, p. 1272-1280, 2014.
3. BASHAN, Y. et al. *Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria*. Biology and Fertility of Soils, v. 35, p. 359-368, 2002.
4. BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química nova, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
5. CRAGGS, R; SUTHERLAND, D; CAMPBELL, H. *Hectare-scale demonstration of high-rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production*. Journal of Applied Phycology, v. 24, n. 3, p. 329-337, 2012.
6. DE SÁ SALOMÃO, A.; MARQUES, M. Estrogenicity and genotoxicity detection in different contaminated waters. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, v. 21, n. 7, p. 1793-1809, 2015.
7. DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. *Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects*. Bioresource technology, v. 101, n. 6, p. 1611-1627, 2010.
8. GAO, Q. T.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. *Removal and biodegradation of nonylphenol by immobilized Chlorella vulgaris*. Bioresource technology, v. 102, n. 22, p. 10230-10238, 2011.
9. GE, L. et al. *Microalgae-promoted photodegradation of two endocrine disruptors in aqueous solutions*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, v. 84, n. 3, p. 331-336, 2009.
10. GONZALEZ, L. E.; BASHAN, Y. *Increased growth of the microalga Chlorella vulgaris when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 4, p. 1527-1531, 2000.
11. JI, Min-Kyu et al. *Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae Chlamydomonas mexicana and Chlorella vulgaris*. Ecological engineering, v. 73, p. 260-269, 2014.
12. JORDÃO, E. P e PESSÓA, C. A. 1995. *Tratamento de Esgotos Domésticos*. 3. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995.
13. MATAMOROS, V., et al. *Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study*. Journal of hazardous materials, v. 301, p. 197-205, 2016b.
14. SOLÉ, A; MATAMOROS, V. *Removal of endocrine disrupting compounds from wastewater by microalgae co-immobilized in alginate beads*. Chemosphere, v. 164, p. 516-523, 2016.
15. SORATTO, J., et al. *Estrategia de Salud de la Familia: una innovación tecnológica en salud*. Texto & Contexto-Enfermagem, v. 24, n. 2, p. 584-592, 2015.
16. VON SPERLING, M. 1996. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. 2. ed. UFMG, 1996.
17. GUO, Q. et al. *Application of Chlorella pyrenoidosa embedded biochar beads for water treatment*. J. Water Proc. Eng. 40, 101892, 2021.
18. JAAFARI, J. et al. *Effective adsorptive removal of reactive dyes by magnetic chitosan nanoparticles: Kinetic, isothermal studies and response surface methodology*. Int. J. Biol. Macromol. 164(1), 344e355, 2020.
19. SUÁREZ, S. et al. *How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 7, n. 2, p. 125-138, 2008.
20. GUIMARÃES, J. R.; NOUR, E. A. A. 2001. *Sewage Treatment*. Thematic Notebooks on New Chemistry at School, v. May, No. Special Edition, 2001.
21. DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. *Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects*. Bioresource technology, v. 101, n. 6, p. 1611-1627, 2010.
22. VOO, W. et al. *Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells*. J. Biosci. Bioeng. 2011