

II-155 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE CELULOSE KRAFT SUBMETIDO A REATOR DE BIOFILME COM LEITO MÓVEL

Lucas Alberto Fernandes Alves⁽¹⁾

Graduando em Química pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Soledad Chamorro⁽²⁾

Doutora em Ciências Ambientais pela Universidad de Concepción, Chile.

Suelen Cristina Vanzetto⁽¹⁾

Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Claudia Regina Xavier⁽¹⁾

Doutora em Ciências Ambientais pela Universidad de Concepción, Chile.

Endereço⁽¹⁾: Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Rua Deputado Heitor Alencar Furtado, 4900 – Curitiba – Paraná – CEP 81280-340 – Brasil – Tel: +55 (41) 3279 4575 – ⁽²⁾Centro de Ciencias Ambientales – Universidad de Concepción – Caixa Postal 160-C – Concepción – Chile – Tel: +56 (41) 220 4002 – e-mail: lucas.alberto91@yahoo.com.br.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência e a remoção de atividade estrogênica em efluente de indústria de celulose kraft, submetido ao processo de tratamento biológico em reator de biofilme com leito móvel (MBBR). Este foi operado a quatro diferentes velocidades de carga orgânica (VCOs): 0,4; 1,2; 4,0 e 9,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Utilizou-se o ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*) para verificar a atividade estrogênica, ao qual se submeteu amostras de entrada e de saída do reator, sob forma de três extratos: de metanol, de acetato de etila e de hexano. A amostra de entrada apresentou atividade estrogênica, a qual pôde ser medida nas frações de caráter mais polar. Nas amostras de saída do reator MBBR, ainda se observou atividade estrogênica, medidas nas frações de caráter apolar para a VCO 4,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e na fração de metanol para a VCO 9,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Assim, não se verificou remoção de atividade estrogênica de efluente de celulose kraft tratado por MBBR em cargas orgânicas volumétricas maiores que 4,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade estrogênica, celulose kraft, MBBR.

INTRODUÇÃO

Os efluentes gerados no processo de produção da celulose kraft podem conter compostos com atividades de interferência endócrina, os quais, quando lançados nos corpos hídricos, podem atuar reciprocamente com o receptor de estrogênio humano, mimetizando hormônios naturais referentes a diversos processos biológicos, como reprodução, crescimento e desenvolvimento (HAMM *et al.*, 2006).

Nos efluentes da indústria de celulose não branqueada, os principais responsáveis pelos efeitos de toxicidade são os ácidos resínicos e os fitoesteróis. Dentre os ácidos resínicos, se encontram o ácido abiético e o ácido deidroabiético, que está relacionado a uma variedade alterações em hepatócitos de peixes, como níveis reduzidos de cortisol no plasma de enguias, bem como efeitos anti-estrogênicos de redução de vitelogenina no plasma de peixe-zebras (ORREGO *et al.*, 2010). No grupo dos fitoesteróis se encontram o estigmasterol e o β -sitosterol, este último já se mostrou responsável por diversos efeitos endócrinos, incluindo atividade estrogênica como alteração nos níveis plasmáticos de hormônios sexuais, produção de esteroides e indução de vitelogenina em peixes-dourados e em trutas-arco-íris (HEWITT *et al.*, 2008).

A presença de compostos com atividade biológica pode ser observada por meio de bioensaios específicos. Dentre esses bioensaios, se encontra o ensaio YES, no qual se utiliza uma cepa de levedura geneticamente modificada com receptor de estrogênio humano para interagir com espécies com atividade estrogênica presentes em uma amostra, obtendo-se uma resposta proporcional à sua quantidade (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). Esta técnica possui alta sensibilidade analítica, especialmente para poder detectar substâncias ou compostos com baixo potencial estrogênico (BOVEE *et al.*, 2006).

Assim, teve-se como objetivo neste trabalho avaliar a ocorrência e remoção de atividade estrogênica em efluente de indústria de celulose kraft, durante o processo de tratamento biológico em reator de biofilme com leito móvel (MBBR).

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – processo 476715/2011-3; da Fundação Araucária (Paraná) – convênio nº 473/2010 - Protocolo Nº: 19.082 e do Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) nº 3120216 - Chile. Os autores também agradecem a Dra. Gladys Vidal, da Universidade de Concepción, Chile, pela disponibilização da infraestrutura para a realização dos ensaios YES.

METODOLOGIA

O efluente utilizado foi gentilmente fornecido por uma indústria localizada na região de Curitiba, que processa celulose kraft de pinus não branqueada e faz o tratamento de efluentes através de uma lagoa aerada. O efluente não tratado (coletado antes da lagoa) foi submetido, em laboratório, a um processo de tratamento biológico realizado em um reator de biofilme com leito móvel (MBBR), em escala de bancada, e operado a quatro velocidades de carga orgânica (VCO) distintas: 0,4; 1,2; 4,0 e 9,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

As amostras de efluente foram recolhidas da entrada e da saída do reator MBBR a cada VCO operada. Estas foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45 μm , e a partir de cada uma delas foram obtidos três extratos em metanol, acetato de etila e hexano, separadamente, por extração em fase sólida. Utilizou-se cartuchos HyperSep C18 fase reversa de 3 mL previamente condicionados com 12 mL de água deionizada e sequencialmente 6 mL de metanol, 6 mL de acetato de etila e 6 mL de hexano. Através destes fez-se passar 200 mL de amostra, em triplicata, sendo a eluição de cada cartucho realizada com 10 mL de um dos três solventes (metanol, acetato de etila ou hexano). Todas as amostras obtidas foram submetidas a secagem com fluxo de nitrogênio.

O ensaio YES foi realizado com base no proposto por Routledge e Sumpter (1996). As amostras foram diluídas serialmente em etanol absoluto na proporção 1:2, transferindo-se 10 μL de cada diluição para uma microplaca de 96 poços. Adicionou-se a eles 200 μL do meio de análise, contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada e o substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida (CPRG), seguido de agitação. Incubou-se a placa por 72 horas a 30 °C, e após isso se realizou a análise espectrofotométrica da placa, a 570 nm (para cor) e 630 nm (para correção de turbidez), com auxílio de um leitor de microplacas. A presença de compostos interagentes com o receptor de estrogênio na levedura pôde ser observada pela simples mudança de coloração do meio, partindo de amarelo (resultado negativo) para rosa (resultado positivo). Para efeitos de comparação, utilizou-se como padrão o composto 17- α -etinilestradiol.

RESULTADOS

Para as amostras das VCOs 0,4 e 1,2 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, não se obtiveram as curvas características de atividade estrogênica, pois não houve mudança de coloração do meio, permanecendo a cor amarela.

Para as amostras de entrada do reator, operado à VCO 9,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, pôde-se observar para os extratos de metanol e acetato de etila a tendência de formação de uma curva de atividade estrogênica, com efeito proporcional ao aumento da concentração de efluente (Figura 1). Por outro lado, observou-se no extrato de hexano efeito tóxico em toda a série de diluição, o que poderia estar associado à interferência de possíveis resíduos do hexano utilizado, bem como os compostos com ele eluídos durante a extração, gerando assim efeitos de atividade estrogênica em concentrações superiores à EC_{50} para esta amostra (FRISCHE *et al.*, 2009).

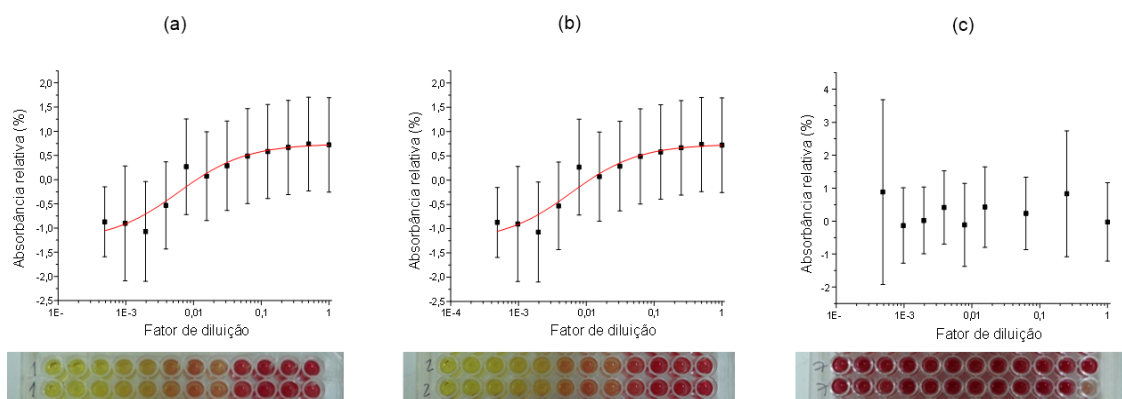


Figura 1: Curvas e imagem das amostras de entrada do reator MBBR submetidas ao ensaio YES: fração de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.

Para o efluente de saída do reator operado à VCO 4,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, pôde-se observar um perfil de curva de atividade estrogênica para as frações de acetato de etila e hexano (Figura 2). Na fração de acetato de etila, houve mudança de coloração em todos os poços; todavia, tendo em vista os altos valores de absorbância obtidos para as maiores concentrações (eixo y da Figura 2a), pode-se atribuir a esse solvente uma maior especificidade em arrastar compostos indutores de resposta estrogênica. Na fração de hexano, os baixos valores de absorbância corrigida para turbidez podem indicar a ocorrência de efeitos tóxicos à cepa. Não se observou o perfil de atividade estrogênica para a fração de metanol, assim não se pôde determinar o nível de efeitos de caráter estrogênico para essa amostra.

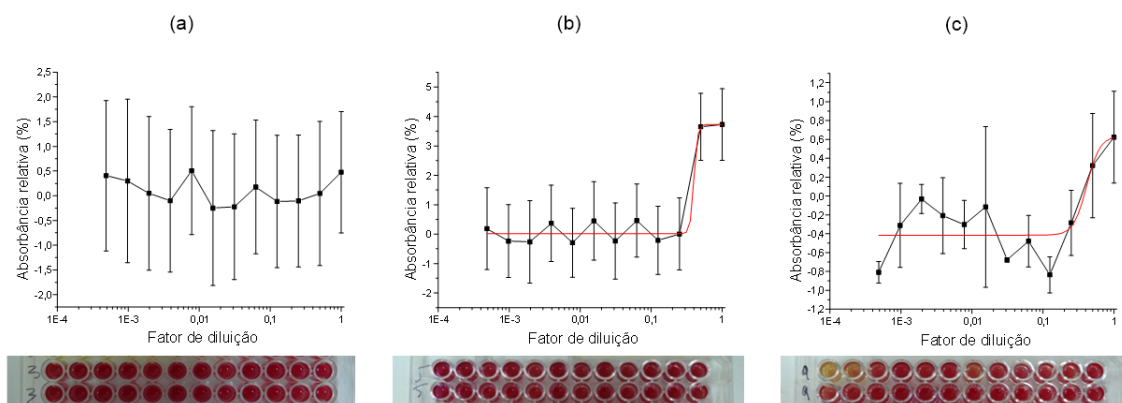


Figura 2: Curvas e imagem das amostras de saída do reator MBBR (VCO 4,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) submetidas ao ensaio YES: fração de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.

Para o efluente de saída do reator operado à VCO 9,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, pôde-se observar um perfil de curva de atividade estrogênica para a fração de metanol, embora ela apresente uma oscilação de valores (Figura 3). Isso pode se dever a fatores como a complexidade da matriz nas amostras trabalhadas, bem como a possíveis efeitos tóxicos causados por metanol residual ou por compostos com ele eluídos e presentes na amostra. Nas outras frações não se observou uma curva típica de atividade estrogênica.

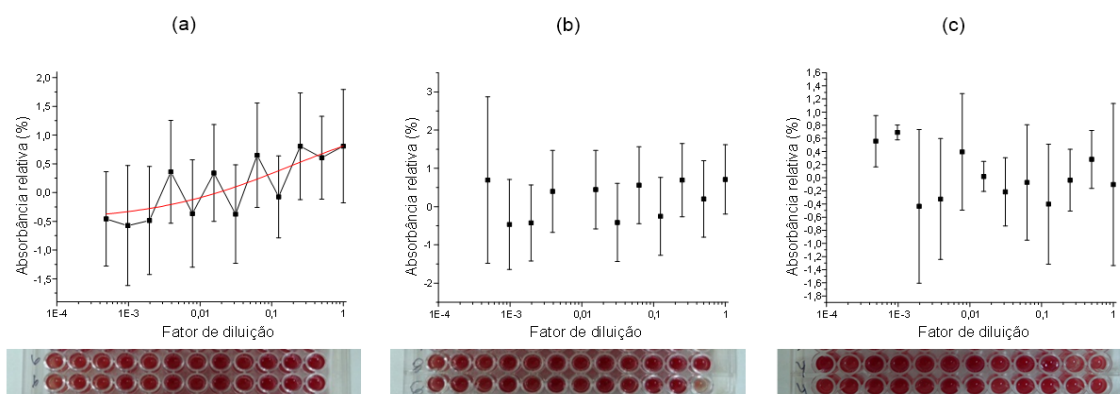


Figura 3. Curvas e imagem das amostras de saída do reator MBBR (VCO 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹) submetidas ao ensaio YES: fração de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.

A atividade estrogênica assim observada não é muito intensa com relação ao padrão, tendo em vista que os valores máximos de indução de atividade se situam próximos de 1,0% de absorbância relativa para todas as amostras (exceto para o extrato de acetato de etila da VCO 4,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹), como pode se ver no eixo y das Figuras 1, 2 e 3, contra valores maiores que 3,0% obtidos para o padrão 17- α -etinilestradiol.

DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos, não se pode afirmar que houve remoção de atividade estrogênica nas amostras analisadas. Isso ocorre possivelmente pela fragmentação de macromoléculas durante o processo de tratamento, as quais podem apresentar maior solubilidade e permeabilidade na membrana celular, acarretando neste caso um maior efeito de atividade estrogênica (XAVIER *et al.*, 2009), o que pode ser justificado pela altas velocidades de carga orgânica aplicadas e pelo baixo tempo de detenção hidráulica a elas associado (inferiores a 2 h).

Em sistemas MBBR tratando efluente de celulose kraft de pinus, quando operados a VCOs entre 0,25 e 1,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹ e com tempos de detenção hidráulica entre 0,5 e 2 d, já se observou um nível de remoção de atividade estrogênica em percentuais próximos a 80% (CHAMORRO *et al.*, 2010). Koh *et al.* (2008) observaram que processos biológicos têm um papel importante na remoção da atividade estrogênica de efluentes, por mecanismos de biotransformação, biodegradação e adsorção. Além disso, a eficiência desses processos depende de parâmetros como velocidade de carga orgânica, idade do lodo e a natureza da microbiota envolvida. Assim, o ajuste e controle desses parâmetros em reatores biológicos pode incrementar a eficiência de remoção desses compostos e, por consequência, da atividade estrogênica em efluente de celulose kraft.

CONCLUSÕES

As amostras de efluente de celulose não branqueada submetidas ao reator MBBR apresentaram atividade estrogênica, para as velocidades de carga orgânica 4,0 e 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹, que pôde ser medida nas frações de caráter mais polar. Nas amostras de saída do reator MBBR, ainda se observou atividade estrogênica, medidas nas frações de caráter apolar para a VCO 4,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹ e na fração de metanol para a VCO 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹. Quando comparados com o padrão 17- α -etinilestradiol, observa-se que esses efeitos são relativamente menos intensos. Assim, não se verificou remoção de atividade estrogênica nas amostras de efluente analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOVEE, T.; BOR, G.; HESKAMP, H.; HOOGENBOOM, R.; NIELEN, M. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Additives and Contaminants*. 2006, Vol. 23, pp. 556-568.
2. CHAMORRO, S.; POZO, G.; JARPA, M.; HERNANDEZ, V.; BECERRA A, J.; VIDAL, G. Monitoring endocrine activity in kraft mill effluent treated by aerobic moving bed bioreactor system. *Water Science & Technology*. 2010, Vol. 62, pp. 154-161.

3. FRISCHE, T.; FAUST, M.; MEYER, W.; BACKHAUS, T. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environmental Science & Pollution Research*. 2009, Vol. 16, pp. 593-603.
4. HAMM, U., SCHABEL, S. e OELLER, H.J. Comparison of the endocrine effects of treated waste waters from different paper mills by use of an in-vitro test with modified yeast cells. *Water Science and Technology*. 2006, Vol. 75, pp. 213-221.
5. HEWITT, L. M.; KOVACS, T. G.; DUBE, M. G.; MACLATCHY, D. L.; MARTEL, P. H.; MCMASTER, M. E.; PAICE, M. G.; PARROTT, J. L.; VAN DEN HEUVEL, M. R.; VAN DER KRAAK, G. J. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: Roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008. Vol. 27, pp. 682-697.
6. KOH, Y.K.; CHIU, T.Y.; BOOBIS, A.; CARTMELL, E.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. *Environmental Technology*. 2008, Vol. 29, pp. 245-267.
7. ORREGO, R. ; GUCHARDI, J.; KRAUSE, R. e HOLDWAY, D. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 2010, Vol. 99, pp. 160-167.
8. ROUTLEDGE, J. e SUMPTER, J. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996, Vol. 15, pp. 241-248.
9. XAVIER, C.; MOSQUERA-CORRAL, A.; BECERRA, J.; HERNANDEZ, V.; VIDAL, G. Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents containing beta-sitosterol and stigmasterol. *Journal of Environmental Science and Health, Part A –Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. 2009, Vol. 44, pp. 327-335.