

III-132 – DETERMINAÇÃO DE ESTROGÊNIOS E BISFENOL A E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM LIXIVIADOS DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS

Fernanda de Oliveira Mury França⁽¹⁾

Engenheira Química pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Mestranda em Engenharia Ambiental na Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Caroline Almeida Teixeira⁽²⁾

Bióloga pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Mestranda em Engenharia Ambiental na Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Daniele Maia Bila⁽³⁾

Engenheira Química pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ). Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ). Pós-Doutorado em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ). Professor adjunto do departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da UERJ. Docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da UERJ (PEAMB).

Endereço⁽¹⁾: Rua Marino Silva, 30 - Bangu – Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21815-500 - Brasil - Tel: (21) 3331-1788 - e-mail: nana.mury@gmail.com

RESUMO

O lixiviado de resíduos sólidos urbanos, líquido escuro formado pela decomposição da massa de lixo e percolação da água da chuva pelos resíduos dispostos, provenientes de aterros sanitários ou não, é uma importante fonte de contaminação das águas subterrâneas e superficiais, caso não haja impermeabilização do solo e tratamento adequado. A complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas presentes no lixiviado pode causar toxicidade aos organismos expostos ou gerar alguma desregulação no sistema endócrino de seres humanos e outros animais, mesmo em concentrações muito baixas, substâncias estas conhecidas como desreguladores endócrinos. Em função dos problemas ambientais ocorridos atualmente, e, visando avaliar o potencial tóxico do lixiviado, bioensaios de toxicidade aguda foram realizados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre organismos de diferentes níveis tróficos (*Lactuca sativa* e *Danio rerio*) e avaliar a eficiência de processos de tratamento. No intuito de determinar a presença de atividade estrogênica e quantificar os estrogênios presentes nas amostras, foram realizados o ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*) e análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/FLU) para a determinação do bisfenol A (BPA) e dos estrogênios estriol (E3), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2). Os lixiviados analisados neste estudo são provenientes de aterros sanitários e de um lixão encerrado na baixada fluminense. A complexidade das amostras e a falta de informações na literatura em relação a análise do ensaio YES em lixiviados, gera incerteza em alguns resultados, uma vez que a interferência de outros compostos químicos presentes na amostra pode confundir a avaliação da atividade estrogênica. Pelas análises cromatográficas, o E3 e BPA foram detectados em todas as amostras. E, com relação aos testes de toxicidade aguda, as amostras se mostraram bastante tóxicas aos organismos-testes.

PALAVRAS-CHAVE: Lixiviado, Desreguladores Endócrinos, Ensaio *in vitro* YES, Toxicidade Aguda, CLAE/FLU.

INTRODUÇÃO

O lixiviado proveniente de resíduos sólidos urbanos (chorume) é gerado em função da decomposição da massa de resíduos e pela percolação da água das chuvas pelos mesmos. A decomposição dos resíduos ocorre segundo a combinação de processos químicos, físicos e biológicos, controlados por fatores como condições climáticas e hidrogeológicas, características dos resíduos dispostos, forma de operação do aterro dentre outros fatores. É uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas, que em sua composição causam danos ao meio ambiente, devido à elevada concentração de matéria orgânica recalcitrante e à toxicidade presentes.

O lixiviado pode contaminar severamente águas subterrâneas e superficiais pela presença de alguns compostos químicos, que causam toxicidade aos organismos expostos. Tendo em vista, os problemas ambientais ocorridos, ensaios de toxicidade aguda têm sido utilizados para avaliar os efeitos de agentes tóxicos presentes na amostra sobre os organismos durante um curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste, além de ser um parâmetro de extrema importância na avaliação da eficiência de processos de tratamento.

Dentre os compostos químicos presentes no lixiviado, os de desregulação endócrina (DE), substâncias que podem afetar o sistema endócrino dos seres humanos e animais mesmo em concentrações muito baixas são investigados atualmente em efluentes de ETE e ETA com muita frequência, mas pouca atenção tem sido dada à determinação e remoção destes compostos de lixiviados de resíduos sólidos urbanos no Brasil. No entanto, devido às altas concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos, dependentes da composição e idade do local de disposição dos resíduos principalmente, alguns xenoestrogênios como o Bisfenol A, por exemplo, estão presentes em lixiviados de aterros sanitários.

Diante da problemática, foi analisada a toxicidade de amostras de lixiviado bruto e tratado, em organismos-teste de níveis tróficos diferentes. Além, da adaptação de uma metodologia de extração utilizando cartuchos de extração em fase sólida (EFS) seguido de ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*) para determinação de atividade estrogênica presente nas amostras, E, uma metodologia via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação e quantificação de estrogênios naturais e sintéticos (estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2)) e do bisfenol A (BPA) no lixivado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas oito amostras, no período de maio de 2015 a fevereiro de 2016, em dois aterros sanitários (Lixiviados A brutos, B bruto e B tratado) e um lixão encerrado (Lixiviado C) localizados na baixada fluminense. Para a identificação das amostras, foram utilizados os códigos conforme apresentados na Tabela 1. As amostras de lixiviado bruto provenientes de dois aterros sanitários foram coletadas na lagoa biológica, e do lixão foi coletado em uma pequena lagoa de acúmulo. As amostras de lixiviado tratado, passaram por um processo físico-químico, seguido por ultrafiltração, e nanofiltração para polimento. Desse último processo, foram coletadas as amostras tratadas analisadas nesse estudo.

Tabela 1: Código das amostras de lixiviado com localização e data de coleta.

| Lixiviado | Data da coleta |
|-----------------------|----------------|
| A1 bruto | 28/05/2015 |
| A2 bruto | 10/06/2015 |
| A3 bruto | 05/11/2015 |
| B1 bruto e B1 tratado | 13/11/2015 |
| B2 bruto e B2 tratado | 19/02/2016 |
| C bruto | 08/09/2015 |

A metodologia utilizada compreende basicamente três etapas: a caracterização físico-química dos lixiviados, ensaios toxicológicos com diferentes organismos-teste e o método de extração em fase sólida (EFS), seguido por ensaio YES e análises cromatográficas pela CLAE/FLU.

Na primeira etapa foram determinados alguns parâmetros físico-químicos para as amostras de lixiviado, de acordo com os métodos descritos em AWWA (APHA, 2012), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias

| Parâmetros | Métodos |
|--|-------------------------------------|
| pH | 4500 – H ⁺ B |
| Turbidez | 2130 B |
| Cor Real e Cor Aparente | 2120 C |
| Condutividade | 2510 B |
| DQO | 5220 D |
| Nitrogênio Amoniacal | 4500- NH ₃ D |
| Nitrato | 4500-NO ₃ ⁻ B |
| Nitrito | 4500-NO ₂ ⁻ B |
| Fósforo Total | 4500 – P E |
| Alcalinidade Total | 2320 B |
| Cloreto | 4500-Cl ⁻ B |
| COD | 5310 B |
| Sólidos Dissolvidos e Suspensos Totais | 2540 C |
| Abs ₂₅₄ | 5910 B |

Além da determinação destes parâmetros físico-químicos, foi realizada a determinação e fracionamento das substâncias húmicas (SH) pelo método de Petterson (1977) modificado de Lowry et al. (1951), que se baseia em uma mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin Ciocalteu) que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador Cu⁺² e produz um composto em absorção máxima de 750 nm.

Algumas das amostras brutas analisadas na determinação de SH foram ainda fracionadas segundo metodologia proposta por Christensen et al. (1998) pelo uso de resinas XAD-8 (Sigma-Aldrich), que possuem maior facilidade de eluição e maior capacidade adsorvente. O método consiste em fracionar a matéria orgânica presente no lixiviado, em forma de substâncias húmicas, em frações de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, e frações hidrofílicas.

Inicialmente, as amostras foram acidificadas até pH 1. Dessa forma, os ácidos húmicos presentes na amostra foram precipitados e separados por centrifugação (5 rpm durante 5 minutos). Em seguida, a amostra foi filtrada em filtro de acetato de celulose de 0,45µm, e, o que ficou retido no filtro (parte sólida) é denominada de fração de ácidos húmicos (AH), que posteriormente foi solubilizada com NaOH 0,05 mol.L⁻¹. A parte não retida no filtro foi percolada pela resina XAD-8, utilizada para reter os ácidos fúlvicos por adsorção. A parte isolada e concentrada na resina é denominada fração de ácidos fúlvicos (AF), solubilizada posteriormente em NaOH 0,1 mol.L⁻¹. E, a matéria orgânica dissolvida residual não absorvida na resina XAD-8 foi considerada como a fração hidrofílica (HYI).

Na segunda etapa, foram realizados ensaios de toxicidade aguda com dois organismos-teste de diferentes níveis tróficos: *Lactuca sativa* (semente de alface – atua como produtor) e *Danio rerio* (peixe – atua como consumidor secundário) de acordo com os métodos descritos em Keddy et al. (1995) com algumas modificações e NBR 15088 (ABNT, 2006), respectivamente.

Para a determinação da toxicidade aguda com o organismo-teste *Lactuca sativa*, inicialmente foi realizado a carta controle, composta por 20 ensaios de sensibilidade usando NaCl como substância de referência, em seis concentrações distintas: 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20 e 0,25 mol/L, realizados em triplicata. O ensaio foi realizado em placas de Petri, com o fundo coberto por papel de filtro embebido com 4 mL das soluções de NaCl. Vinte sementes foram dispostas em cada placa, em seguida foram vedadas e colocadas na estufa à temperatura de 22 ± 2 °C, por 5 dias (120h) de exposição, na ausência de luz, para avaliação do crescimento radicular. As condições do ensaio definitivo foram as mesmas do ensaio de sensibilidade, porém o filtro de papel era embebido com as amostras nas concentrações 0,75; 1,5; 3; 6; 12; 25; 50 e 100%, diluídas em água destilada. A análise permite a determinar o efeito do alongamento da raiz em presença de substâncias tóxicas através da CE50.

No ensaio de toxicidade aguda, a carta controle do *Danio rerio* já estava pronta e para a realização da mesma, 19 ensaios foram realizados com dicromato de potássio. No ensaio, foram expostos 10 organismos em 1 litro de cada amostra em diferentes concentrações, sendo mantidos em contato por 48 horas. As amostras de lixiviado bruto, provenientes dos aterros sanitário e lixão, foram analisadas em concentrações de 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25% e as amostras de lixiviado tratado, foram analisadas em concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25% utilizando água de cultivo como controle. Após ensaio, os organismos mortos foram contabilizados e através do software GWBASIC foram determinados os resultados expressos em CL50.

Na terceira etapa, referente a extração em fase sólida (EFS), todos os frascos utilizados nas coletas das amostras e as vidrarias utilizadas ao longo de todo processo da extração foram devidamente limpos com solução a 5% de um concentrado de tensoativos (Extran®, Merck). Os frascos e vidrarias ficaram submersos na solução de extran por 24 horas, em seguida foram enxaguados 10 vezes com água de torneira para remoção do extran. Logo após, a vidraria foi rinsada uma vez com acetona (grau HPLC, Tedia), cinco vezes com água ultra pura, uma vez com etanol (grau HPLC, Tedia) e três vezes com água ultra pura, necessariamente nessa ordem.

Para a determinação de atividade estrogênica pelo ensaio in vitro YES e identificação dos estrogênios e o bisfenol A por CLAE, as amostras de lixiviado bruto e tratado precisam ser concentradas, uma vez que os analitos de interesse são normalmente encontrados em concentrações baixíssimas, e isolados anteriormente as análises, favorecendo sua detecção nas amostras. Para isso, foi utilizada a técnica de extração em fase sólida (EFS), que compreende várias etapas: condicionamento dos cartuchos, passagem da amostra pelos cartuchos, clean up e eluição, conforme demonstrado na Figura 1.

Neste estudo, as extrações foram realizadas utilizando dois tipos de cartuchos: o cartucho Strata SAX (cartucho de limpeza para remoção dos interferentes da amostra) acoplado ao cartucho Oasis HLB.

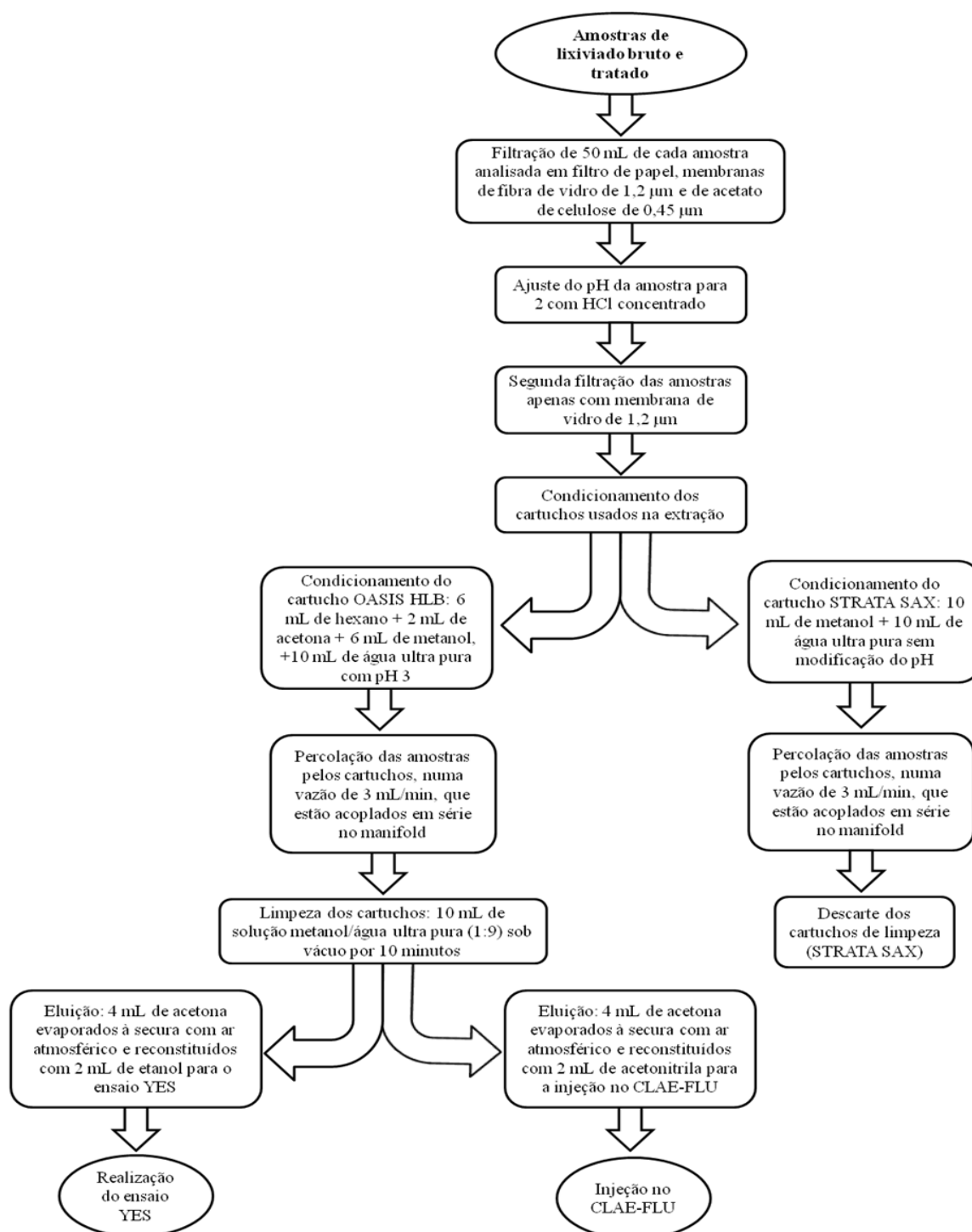


Figura 1 – Fluxograma detalhado das etapas de preparo das amostras até o extrato final para a realização do ensaio YES e para análise na CLAE.

O procedimento de análise do ensaio *in vitro* YES foi desenvolvido de acordo com a metodologia de Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços (Kasvi) e preparadas em capela de fluxo laminar.

Para a realização do ensaio YES é necessário a diluição dos extratos da amostra obtido na etapa anterior através da EFS, garantindo dessa forma, que a concentração da amostra esteja dentro da curva do controle

positivo. Após o preparo das placas, são incubadas em estufa por 72 horas, e após este período são removidas sendo possível a observação de alteração da coloração dos poços da fileira da amostra, de rosa para roxo, caso haja atividade estrogênica na amostra analisada, em função da produção da β -galactosidase. E, há também aumento da turbidez nos poços, em virtude do crescimento da levedura.

Com o auxílio do espectrofotômetro (Softmax Pro 5, SpectraMax M3) com entrada para placas de 96 poços, foi realizado a leitura das mesmas em dois comprimentos de onda: 575 nm e 620 nm, para cor e turbidez, respectivamente. Por isso, há necessidade da correção da absorbância da amostra, em cada um dos poços. Para o cálculo da correção da absorbância, foi feita a média dos valores das absorbâncias das fileiras de branco de cada uma das amostras (linhas B e D ou F e H). O valor da absorbância corrigida pode ser determinado de acordo com Bila (2005), segundo a equação 1:

$$\text{Abs corrigida Amostra} = \text{Abs}_{575} \text{ Amostra} - (\text{Abs}_{620} \text{ Amostra} - \text{Abs}_{620} \text{ Branco}) \quad \text{equação (1)}$$

Após a correção da absorbância das amostras, pode-se construir as curvas dose-resposta com o auxílio do programa Origin® 6.0, relacionando os valores de absorbância corrigida em função da concentração (ng.L^{-1}) em escala logarítmica em relação ao controle positivo 17 β -estradiol ou em percentual em relação aos extratos das amostras.

Portanto, foi determinado o CE50 do 17 β -estradiol que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão. E, para as amostras, foi calculado o equivalente estradiol (EQ-E2) da máxima indução da β -galactosidase, através da interpolação dos dados da curva da amostra com os da curva do controle positivo 17 β -estradiol, conforme a equação 2:

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad \text{equação (2)}$$

Sendo:

Y = valor da Abs corrigida da Amostra;

x = concentração da substância estrogênica no ensaio (EQ-E2);

A_1 = máxima indução da atividade estrogênica;

A_2 = mínima indução da atividade estrogênica;

x_0 = valor de EC50; e

p = inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta.

A toxicidade é algo presente em amostras mais complexas, devido a presença de compostos tóxicos, podendo gerar a inibição do crescimento da levedura, facilmente visualizada pela ausência de turbidez no fundo do poço. Nesse caso, de acordo com Frische et al. (2009), foi utilizado o controle da absorbância a 620 nm para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido a toxicidade das amostras (equação 3).

$$\text{Toxicidade} = 1 - \left(\frac{\text{Abs}_{620}(\text{amostra})}{\text{Abs}_{620}(\text{branco})} \right) \quad \text{equação (3)}$$

Os estrogênios 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em um cromatógrafo fabricado pela Waters Corporation®, utilizando detector de fluorescência com comprimentos de onda de emissão à 306 nm e excitação à 280 nm. A metodologia implementada para detecção e quantificação dos hormônios foi fundamentado no trabalho de Oliveira (2015) com algumas modificações conforme Silva (2016) tendo em vista, melhor eficiência do método.

As condições de análise para os estrogênios foram: fluxo de 1 mL/min de fase móvel, modo gradiente variando a percentagem de acetonitrila (ACN) e água ultra pura, iniciando com 40% de ACN, mudando para 50 % em 6 minutos, 30 % em 9 minutos e 40% após 13 minutos até o tempo total de corrida de 15 minutos para a análise

dos hormônios. As fases móveis utilizadas (ACN e água ultra pura) possuem alto grau de pureza e estão livres de oxigênio e outros gases dissolvidos. O volume injetado foi de 20 µL com três repetições para cada amostra e a temperatura do amostrador foi fixada em 18°C com o objetivo de evitar possíveis degradações das amostras ao longo da análise.

Para a determinação do bisfenol A (BPA), foi utilizado o mesmo equipamento de CLAE/FLU, mas empregando um método diferente do usado na determinação dos estrogênios. As condições de análise foram fixadas em 55% de acetonitrila e 45% de água ultra pura como fase móvel em um fluxo de 1 mL/min no modo isocrático resultando em um tempo de corrida de 8 minutos. A metodologia foi desenvolvida em detector de fluorescência com comprimentos de onda de emissão à 300 nm e à 223 nm de excitação. O volume de injeção foi de 20 µL em triplicata, mantendo a temperatura da coluna em 40°C e do amostrador em 18°C.

Para validação do método descrito, o guia sobre validação de métodos analíticos, fornecido pelo INMETRO (2010) que analisa a seletividade, LD, LQ, linearidade e recuperação, tanto para os hormônios como para o BPA. De acordo com o guia, a linearidade foi determinada em função da curva padrão avaliando os valores de R e R², o LQ foi obtido pela menor concentração da curva analítica e o LD foi obtido segundo a equação 4, sendo DP o desvio padrão referente as três injeções do branco (padrão com a menor condição aceitável do analito).

$$LD = DP \times 6,965$$

equação (4)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta os valores médios dos parâmetros físico-químicos das amostras de lixiviado A brutos, B bruto e B tratado, e C bruto.

As faixas de valores de cloreto e alcalinidade na literatura encontram-se normalmente altas, em torno de 2199 a 4204 mg/L e 3325 a 5015 mg/L, respectivamente, em lixiviados de aterros no Brasil. Neste estudo, a alcalinidade encontra-se dentro da faixa encontrada e o cloreto bem acima da faixa, indicando apenas alta carga de matéria orgânica, e geralmente não se tornam problema de toxicidade para os microrganismos responsáveis pela degradação biológica.

Quantidades significativas de matéria orgânica podem estar presentes no lixiviado, e como consequência da idade do aterro, valores mais baixos de DQO são relatados em aterros mais velhos como é o caso dos lixiviados estudados, provenientes de aterros com mais de dois anos de operação.

Com relação às substâncias húmicas, lixiviados brutos apresentaram elevadas concentrações, porém após tratamento há considerada remoção da cor da amostra, demonstrando correlação entre os parâmetros. Nos lixiviados tratados não há presença de substâncias húmicas, devido à remoção total das mesmas após tratamento utilizando nanofiltração como polimento.

Tabela 3: Valores médios dos parâmetros físico-químicos das amostras de lixiviado proveniente de aterro sanitário (A brutos, B bruto e B tratado) e da amostra proveniente do lixão encerrado (C).

| Parâmetros físico-químicos | Lixiviado A (N = 3) | Lixiviado B bruto (N = 2) | Lixiviado B tratado (N = 2) | Lixiviado C (N = 1*) | Unidade |
|----------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------|
| pH | 8,1 | 8,2 | 6,7 | 8,3 | - |
| COD | 2590 | 527 | 100 | 505 | mg de C/L |
| DQO | 487 | 791 | 636 | 163 | mg O ₂ /L |
| Alcalinidade Total | 4617 | 2865 | 119 | 2473 | mg CaCO ₃ /L |
| Nitrogênio Amoniacal | 1651 | 1249 | 292 | 575 | mg N- NH ₃ /L |
| Cloreto | 4505 | 3233 | 2343 | 1150 | mg Cl/L |
| Cor Aparente | 180 | 140 | 15 | 249 | Units Pt/Co |
| Cor Real | 154 | 80 | 12 | 114 | Units Pt/Co |
| Turbidez | 148 | 114 | 0,1 | 236 | NTU |
| Fósforo Total | 10,1 | 2,9 | 0,1 | 6,8 | mg de P/L |
| Sólidos Dissolvidos Totais | 12684 | 8187 | 5419 | 5020 | mg/L |
| Sólidos Suspensos Totais | 216 | 249 | 63 | 196 | mg/L |
| Condutividade a 25°C | 20,8 | 17 | 14,3 | 7,8 | S/cm |
| Substâncias húmicas | 3213 | 1520 | 0 | 1449 | mg/L |
| Abs ₂₅₄ | 0,67 | 0,72 | 0,07 | 0,68 | nm |

N = número de amostras (*foi realizado somente uma coleta do lixiviado proveniente do lixão, devido ao encerramento da lagoa logo após a coleta).

Sabendo que, a composição do lixiviado muda de acordo com a idade do aterro, em aterros mais velhos, grande parte do lixiviado formado é composto por produtos orgânicos húmicos e fúlvicos. Nesse sentido, três amostras brutas do estudo foram analisadas em função dessas frações húmicas e fúlvicas (Tabela 4).

Tabela 4: Concentração de substâncias húmicas das Amostras A3 bruta, B1 bruta e C bruta, e suas respectivas frações de ácido húmico e ácido fúlvico.

| Amostra | [SH] (mg/L) |
|-------------|-------------|
| A3 bruta | 3243 |
| A3 bruta AH | 872 |
| A3 bruta AF | 2268 |
| B1 bruta | 1424 |
| B1 bruta AH | 529 |
| B1 bruta AF | 880 |
| C bruta | 1449 |
| C bruta AH | 571 |
| C bruta AF | 836 |

Do total de substâncias húmicas presente na amostra: A3 bruta - 27% é correspondente as frações de ácido húmico e 70% as frações de ácido fúlvico; B1 bruta - 37% é correspondente as frações de ácido húmico e 62% as frações de ácido fúlvico; e C - 39% é correspondente as frações de ácido húmico e 58% as frações de ácido fúlvico. Como observado, a concentração de ácidos fúlvicos presente nos lixiviados é maior que a dos ácidos húmicos. No estudo de Moravia (2010) também houve a predominância de ácidos fúlvicos na amostra de lixiviado de aterro, caracterizado com 92% do total de substâncias fúlvicas.

Com relação aos testes de toxicidade, para a realização dos ensaios de sensibilidade foram utilizados substâncias de referência diferentes para cada organismo. O valor médio encontrado de sensibilidade da *Lactuca sativa* foi CE50 igual a $0,09 \pm 0,03$ mol/L de NaCl e para o *Danio rerio* foi CL50 igual a $126 \pm 7,43$ mg/L de dicromato de potássio. Na Tabela 5 são apresentados os valores referentes a CE(L)50 dos organismos analisados no ensaio com as amostras de lixiviado.

Tabela 5: Valores de CE(L)50 para os diferentes organismos.

| Amostra | <i>Lactuca sativa</i> | <i>Danio rerio</i> |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|
| A1 | 5,06 | 1,11 |
| A2 | 7,11 | 1,10 |
| A3 | 2,82 | 1,10 |
| B1 bruta | 7,38 | 1,82 |
| B1 tratada | 18,54 | 16,49 |
| B2 bruta | 11,57 | * |
| B2 tratada | 15,66 | 18,95 |
| C | 23,85 | 4,42 |
| *CE(L)50 não determinado | | |

Com relação ao teste de toxicidade utilizando as sementes de alface, as amostras mais tóxicas coincidiram com os resultados encontrados na literatura, onde a maior toxicidade do efluente estava diretamente ligada às amostras com a maior concentração média de nitrogênio amoniacal, como é o caso das amostras A e B brutas analisadas que apresentam 1651 e 1249 mg/L de nitrogênio amoniacal, respectivamente. Em contrapartida observou-se na amostra C uma concentração de nitrogênio amoniacal maior que a concentração média das amostras tratadas e mesmo assim, apresentou valor de CE50 de 23,85%, representando uma toxicidade menor que a encontrada nas duas amostras tratadas, indicando que outras substâncias podem conferir toxicidade ao lixiviado ou outros fatores podem ter influenciado nos resultados finais. Durante o processo de tratamento o fósforo foi praticamente removido das amostras B1 tratada e B2 tratada, permanecendo com concentrações do mesmo muito menores quando comparado ao lixiviado C bruto. Como o fósforo é um macronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, a maior concentração desse elemento na amostra C bruta pode ter mascarado o efeito tóxico do efluente, promovendo um alongamento radicular maior do que em amostras com menor concentração de nitrogênio amoniacal.

No ensaio utilizando *Danio rerio*, as amostras A brutas apresentaram maior toxicidade sobre os organismos, em relação à amostra B1 bruta. Os valores de CE50 determinados no lixiviado tratado (B1 e B2) apresentaram toxicidades semelhantes, demonstrando pouca interferência quanto à época do ano em que foram coletados. Alves (2010) relatou reduções de toxicidade do lixiviado bruto para o tratado de até 70,49% provenientes de aterros sanitários de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul após tratamento biológico, diferentemente deste estudo, que a redução da toxicidade foi de apenas 14,67%, caracterizando um lixiviado com elevado potencial de toxicidade, após tratamento físico-químico, seguido por ultrafiltração e nanofiltração.

As amostras brutas do aterro B apresentam em média valores mais altos de CE50 que o aterro A, ou seja, apresentaram menor toxicidade aos dois organismos-teste. Provavelmente, esses dados são influenciados por concentrações um pouco mais elevadas de substâncias húmicas e amônia, principalmente, atribuindo maior toxicidade as amostras do lixiviado A. Ao comparar a mesma amostra de lixiviado, bruta e tratada, percebe-se a redução da toxicidade após o tratamento das amostras, devido à redução dos parâmetros analisados.

A EFS foi realizada utilizando cartuchos acoplados, Strata SAX + Oasis HLB, para determinação de atividade estrogênica nas amostras de lixiviado bruto e tratado, com volume de extração fixo de 50 mL. Das amostras analisadas, apenas duas apresentaram atividade estrogênica, contudo, foram observadas anormalidades no ensaio YES, demonstrando a necessidade de modificações na etapa de preparo das amostras visando à eliminação de interferentes, mesmo utilizando um cartucho de limpeza, visto que, as análises cromatográficas realizadas simultaneamente demonstraram a presença de desreguladores endócrinos com atividade estrogênica.

Dessa forma, após a acidificação da amostra para correção de pH na EFS, foi realizado uma segunda filtração da amostra, devido a sedimentação dos sólidos presentes na mesma ao corrigir o pH. Portanto, após mudança de pH, e consequente filtração, cada amostra analisada foi percolada pelos cartuchos em série: Strata SAX e Oasis HLB, nessa ordem.

Após a realização do ensaio YES, as amostras A1, A2, A3 e C demonstraram presença de atividade estrogênica, mas nas amostras B1 bruta e tratada, não foi possível a determinação da CE50 em função de

interferentes nas mesmas. No entanto, na presença de interferentes, não há crescimento da célula, o que não ocorreu e, além disso, há determinação de estrogênios na mesma amostra pela identificação pela CLAE/FLU.

Explicações podem ser sugeridas em função da análise das curvas das amostras B1 bruta e tratada, como: a presença de um composto diferente dos DE presentes na amostra, que possa interferir em algum outro mecanismo impedindo a expressão da β -galactosidase; ou talvez ocorra a expressão da enzima, mas a mesma está sendo consumida por outra substância antes de degradar o CPRG; ou ainda a presença de uma substância que se liga ao receptor de estrogênio, originando um falso negativo.

Segundo estudos, a presença dos acetatos de alquilfenóis, suprimem a atividade estrogênica de esteroides e dos próprios alquilfenóis, logo, poderia ser também uma explicação para os fatos ocorridos na amostra B1 bruta e tratada, uma vez que, na literatura foi identificada a presença de alquilfenóis em lixiviados, além da presença do nonilfenol, que são provenientes da alquilação de fenóis, que é encontrado em lodos de aterro.

As amostras de lixiviado A1, A2 e A3 brutas, B1 bruta e tratada e C bruta, apresentaram concentrações de substância estrogênica no ensaio (EQ-E2) de acordo com a Tabela 6. Como não foi possível a realização do ensaio YES para as amostras B2 bruta e tratada, as concentrações de EQ-E2 para as mesmas não se encontram na tabela 6.

Tabela 6: Valores de EQ-E2 (ng. L⁻¹) em cada amostra de lixiviado analisado.

| Amostra | EQ-E2 (ng. L ⁻¹) |
|------------|------------------------------|
| A1 | 30,20 |
| A2 | 34,91 |
| A3 | 39,71 |
| B1 bruta | 5,78 |
| B1 tratada | 6,01 |
| C | 1,62 |

Com relação a identificação e quantificação dos DEs analisados no estudo, os lixiviados do aterro A apresentaram concentrações mais elevadas. Ao comparar as amostras brutas e tratadas, B1 e B2, é notório a redução de toxicidade para o lixiviado tratado, entretanto, ainda apresentam concentrações bastante elevadas após tratamento. Na Tabela 7, podem ser observadas as concentrações dos DE analisados no estudo.

Tabela 7: Concentrações dos hormônios E3, E2 e EE2 e do BPA determinados na CLAE/FLU.

| Amostra | E3 (mg. L ⁻¹) | E2 (mg. L ⁻¹) | EE2 (mg. L ⁻¹) | BPA (mg. L ⁻¹) |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| A1 | 1,57 | 2,36 | 1,93 | 1,39 |
| A2 | 1,23 | 1,99 | 1,96 | 1,34 |
| A3 | 1,02 | 1,91 | 2,03 | 1,51 |
| B1 bruta | 0,33 | 0,24 | 0,07 | 0,88 |
| B1 tratada | 0,13 | ND | 0,01 | 0,04 |
| B2 bruta | 0,33 | 0,23 | 0,04 | 1,21 |
| B2 tratada | 0,12 | 0,18 | ND | 0,07 |
| C | 0,12 | ND | 0,06 | 0,07 |
| Observação: ND = não determinado | | | | |

Em relação a presença dos hormônios analisados, das oito amostras de lixiviado, duas não identificaram a presença de E2, no entanto, uma é amostra tratada, demonstrando a eficiência do tratamento para a eliminação deste hormônio, e a outra é a amostra de lixiviado proveniente do lixão, que demonstrou características físico-químicas mais discrepantes das do lixiviado de aterro. O EE2 também não foi quantificado em uma das amostras tratadas e o E3 e BPA, foram determinados em todas as amostras.

CONCLUSÕES

Com relação a toxicidade aguda, todas as amostras analisadas, brutas e tratadas, demonstraram-se tóxicas aos organismos *Danio rerio* e *Lactuca sativa*. As amostras tratadas apresentaram menor toxicidade quando comparadas as amostras brutas. A menor toxicidade pode ser atribuída, em parte, pela redução dos parâmetros físico-químicos após o tratamento.

Pelas análises físico-químicas, foram determinados altos valores de cloreto, COD, e substâncias húmicas, nas amostras, não podendo atribuir ao nitrogênio amoniacal isoladamente, a possível causa de toxicidade das mesmas.

Devido a complexidade da matriz de estudo, foi necessária uma metodologia para otimização da etapa de percolação da amostra na EFS, utilizando cartuchos acoplados, sendo um dos cartuchos utilizado apenas para remoção dos interferentes e o outro para adsorção do analito de interesse.

O ensaio YES, mostrou-se eficiente na determinação de atividade estrogênica em algumas amostras, no entanto, a complexidade da matriz resultou em falsos negativos, devido a presença de interferentes em algumas amostras, dificultando as análises.

Pela CLAE/FLU foi confirmada a presença de BPA em todas as amostras, diferentemente de alguns dos hormônios que não foram detectados no lixiviado do lixão, e em algumas amostras tratadas, mostrando a eficiência do tratamento na remoção de alguns DE presentes na amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, S. D. Estudo comparativo da sensibilidade de dois organismos expostos a efluentes líquidos. Dissertação - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
2. APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 22 th Ed. American Public Health Association, Washington, D. C. 1360p., 2012.
3. ARAUJO, C. B. A.; YALLOUZ, A. V.; EGLER, S. Avaliação da toxicidade aguda de *Daphnia similis* a chorumes de diferentes origens e a soluções de metais pesados. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo, 2010.
4. ASAKURA, H.; MATSUTO, T.; TANAKA, N. Behavior of endocrine-disrupting chemicals in leachate from MSW landfill sites in Japan. Waste Management, V. 24, p. 613-622, 2004.
5. BILA, D. M. Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17β-Estradiol pelo Processo de Ozonização. Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 281 p., 2005.
6. COORS, A.; JONES, P. D.; GIESY, J. P.; RATTE, H. T. Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. Environmental science & technology, v. 37, n. 15, p. 3430-3434, 2003.
7. CHRISTENSEN, J. B.; JENSEN, D. L.; GRON, C.; FILIP, Z.; CHRISTENSEN, T. H., Characterization of the dissolved organic carbon in landfill leachate-polluted groundwater. p. 125-135, 1998.
8. INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 3. ed. [S.l.]: Coordenação Geral de Acreditação, 2010. DOQ-CGCRE-008.
9. ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A. Toxicity Identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. Chemosphere, 52, 85-94, 2003.
10. KEDDY, C. J.; GREENE, J. C.; BANNELL, M. A. Review of whole-organism bioassays - soil, fresh-water, and fresh water assessment in Canada. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 30, p. 221-251, 1995.
11. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, R.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v.193, p.265-275, 1951.
12. MORAVIA, W. G. Avaliação do tratamento de lixiviado de aterro sanitário através de processo oxidativo avançado conjugado com sistema de separação por membranas. Dissertação – Universidade Federal de Minas Geras, Belo Horizonte, MG, 262p., 2010.

13. OLIVEIRA, M. M. Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na Bacia de Jacarepaguá, RJ. Dissertação – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, PEAMB, 2015.
14. PACHECO, J. R. Estudo de certas potencialidades de processos oxidativos avançados para o tratamento de percolato de aterro sanitário. Dissertação – Universidade Federal do Paraná, Setor de ciências exatas, Curitiba, PR, 81p., 2004.
15. PETERSON, G. L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356, 1977.
16. REIS, B. G. Avaliação da Eficiência de Processos Avançados na Remoção de Toxicidade de Lixiviado de Aterro Sanitário. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, Belo Horizonte, 172 p., 2014.
17. ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (3), 241-248, 1996.
18. SILVA, L. L. S. Utilização de UV/H₂O₂ e osmose inversa para remoção de estrogênios presentes em esgoto sanitário biotratado. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 164 p., 2016.
19. SILVA, G. G. M. Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica. Dissertação – Universidade Estadual do Rio de Janeiro, PEAMB, 119p., 2015.
20. SOUTO, G. D. B. Lixiviados de Aterros Sanitários Brasileiros – Estudo de Remoção do Nitrogênio Amoniacal por Processo de Arraste de Ar (“stripping”). Tese – Universidade de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, 371 p., 2009.
21. TCHOBANOGLOUS, G.; THEISEN, H.; Vigil, S. *Integrated Solid Waste Management – Engineering Principles and Management Issues*. IRWIN/McGRAW- HILL, USA, 1993.
22. USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Ecological effects test guidelines: Seed germination/root elongation toxicity test. 1996.
23. VARNERO, M. T. M.; ROJAS, C. A.; ORELLANA, R. R. Índices de fitotoxicidad em resíduos orgânicos durante El compostaje. *Nutr. Veg., Temuco*, v.7, n. 1, p. 28-37, 2007.
24. ZHANG. H.; CHANG, C.; LU, F.; LEE, D.; He, P.; SHAO, L. SU, A. Estrogenic activity of fractionate landfill leachate. *Science of the Total Environment*, 407, 879-886. 2009.