

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM EFLUENTE DE  
INDÚSTRIA DE CELULOSE KRAFT TRATADO POR REATOR DE  
BIOFILME COM LEITO MÓVEL**

**Lucas Alberto Fernandes Alves<sup>(1)</sup>**

Graduando em Química pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

**Soledad Chamorro<sup>(2)</sup>**

Doutora em Ciências Ambientais pela Universidad de Concepción, Chile.

**Suelen Cristina Vanzetto<sup>(1)</sup>**

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

**Gladys Vidal<sup>(2)</sup>**

Doutora em Ciências Químicas pela Universidad de Santiago de Compostela, Espanha.

**Claudia Regina Xavier<sup>(1)</sup>**

Doutora em Ciências Ambientais pela Universidad de Concepción, Chile.

**Endereço:** <sup>(1)</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Rua Deputado Heitor Alencar Furtado, 4900 – Curitiba – Paraná – CEP 81280-340 – Brasil – Tel: +55 (41) 3279 4575 – <sup>(2)</sup> 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 cargas orgânicas volumétricas (VOCs): 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 VOC 4,0  $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  e na fração de metanol para a VOC 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). Decorrente disso, podem-se observar efeitos crônicos como redução da quantidade de fitoplâncton, toxicidade em peixes e bioacumulação em tecidos, bem como efeitos agudos como a morte de organismos (XAVIER *et al.*, 2005). Nos efluentes da indústria de celulose não branqueada, os principais responsáveis pelos efeitos de toxicidade são os ácidos resínicos (ácido abiético e ácido deidroabiético) e os fitoesteróis (estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol) (ORREGO *et al.*, 2010).

A presença de espécies com atividade biológica pode ser observada por meio de bioensaios específicos. Dentre esses bioensaios, se encontra o ensaio YES (do inglês *yeast estrogen screen*), 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 *et al.*, 1996). Esta técnica possui alta sensibilidade analítica, especialmente para poder detectar substâncias ou compostos com baixo potencial estrogênico (BOVEE *et al.*, 2006).

Por isso, neste trabalho teve-se como objetivo 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).

## METODOLOGIA

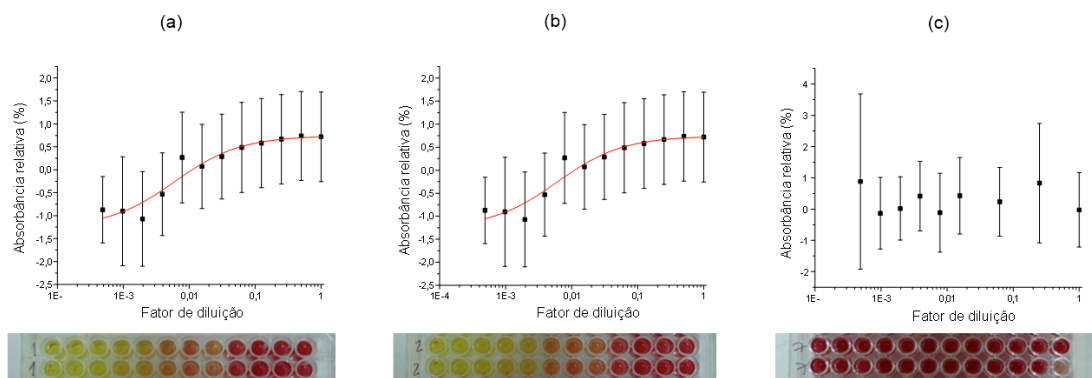
O efluente utilizado foi gentilmente fornecido por uma indústria localizada na região de Curitiba, que processa celulose kraft de pinus não branqueada e faz o tratamento de efluentes através de uma lagoa aerada. O efluente não tratado (coletado antes da lagoa) foi submetido, em laboratório, a tratamento em um reator de biofilme com leito móvel (MBBR), em escala de bancada, e operado a quatro cargas orgânicas volumétricas (VOC) 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 VOC operada. Estas foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$ , e a partir de cada uma delas foram obtidos três extratos, separadamente, em metanol, acetato de etila e hexano, 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 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  $\mu\text{L}$  de cada diluição para uma microplaca de 96 poços. Adicionou-se a eles 200  $\mu\text{L}$  do meio de análise, contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada e o substrato cromogênico clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosida (CPRG), seguido de agitação. Incubou-se a placa por 72 horas a 30 °C, e após isso se realizou a leitura 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- $\alpha$ -etinilestradiol.

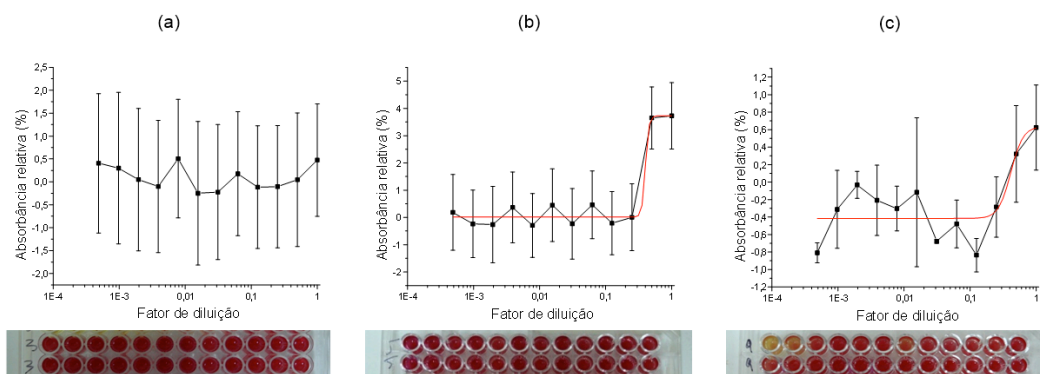
## RESULTADOS

Para as amostras de entrada do reator, 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 a compostos com ele eluídos durante a extração, gerando assim efeitos de atividade estrogênica para esta amostra (FRISCHE *et al.*, 2009).



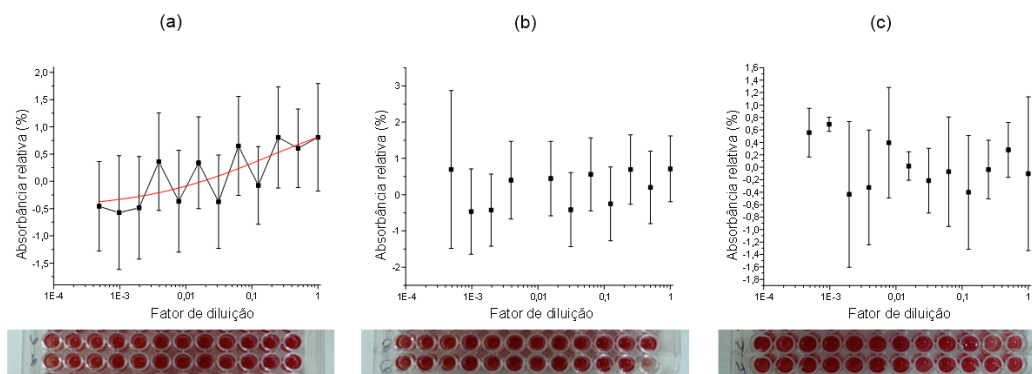
**Figura 1: Curvas e imagem das amostras de entrada do reator MBBR submetidas ao ensaio YES: fração de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.**

Para o efluente de saída do reator operado à  $VOC\ 4,0\ g_{DQO}\cdot L^{-1}\cdot d^{-1}$ , 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, 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 tal perfil para a fração de metanol, assim não se pôde determinar o nível de efeitos de caráter estrogênico para essa amostra.



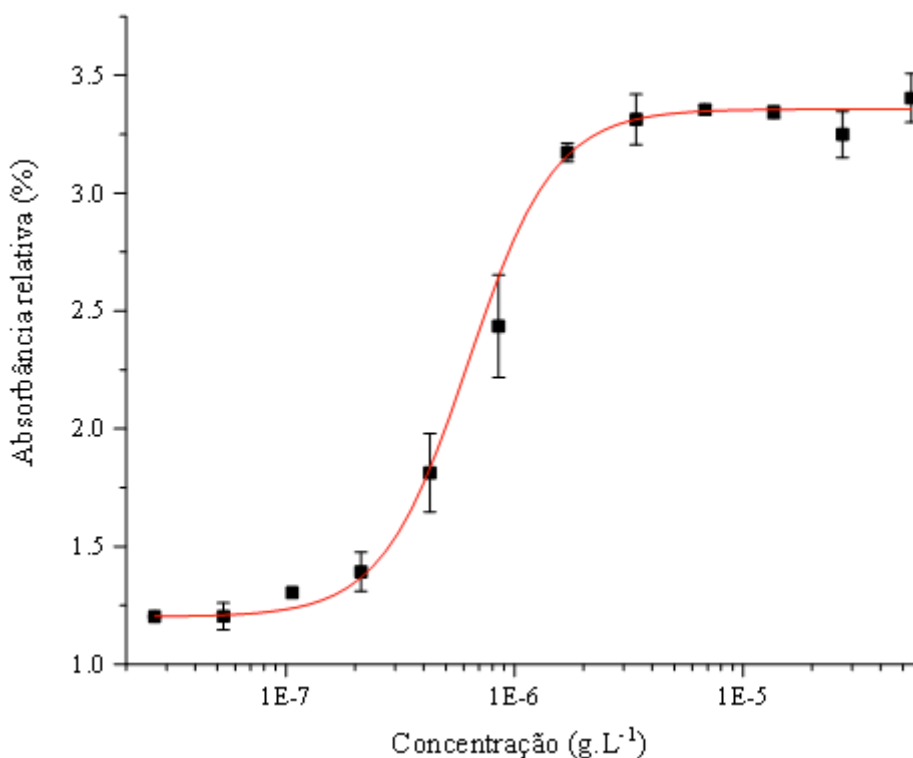
**Figura 2: Curvas e imagem das amostras de saída do reator MBBR ( $VOC\ 4,0\ g_{DQO}\cdot L^{-1}\cdot d^{-1}$ ) submetidas ao ensaio YES: fração de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.**

Para o efluente de saída do reator operado à  $VOC\ 9,0\ g_{DQO}\cdot L^{-1}\cdot d^{-1}$ , 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 (VOC 9,0 g<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) 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 absorvância relativa para todas as amostras (exceto para o extrato de acetato de etila da VOC 4,0 g<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), comparado com valores maiores que 3,0% obtidos para o padrão 17- $\alpha$ -etinilestradiol (Figura 4).



**Figura 4. Curva padrão de 17- $\alpha$ -etinilestradiol.**

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 pós-tratamento (XAVIER *et al.*, 2009), o que pode ser justificado pela altas cargas orgânicas volumétricas aplicadas e pelo baixo tempo de detenção hidráulica a elas associado (inferiores a 2 h). Nestes sistemas, operados com tempos de detenção hidráulica entre 0,5 e 2 d e operados a VOCs entre 0,25 e 1,0 g<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, foi observada remoção da atividade estrogênica em torno de 80% (CHAMORRO *et al.*, 2010), sendo que esta remoção pode ser atribuída a mecanismos de biotransformação, biodegradação e adsorção. Tal eficiência observada poderia ser incrementada, dependendo de

outros fatores como carga orgânica volumétrica, idade do lodo e a natureza da microbiota envolvida (KOH *et al.*, 2008).

## CONCLUSÃO

A amostra de efluente de celulose não branqueada submetida ao reator MBBR 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 VOC  $4,0 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e na fração de metanol para a VOC  $9,0 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Assim, para elevadas VOCs não se evidenciou remoção de atividade biológica por tratamento com MBBR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOVEE, T., *et al.* 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., *et al.* 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., *et al.* 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. KOH, Y.K., *et al.* Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. *Environmental Technology*. 2008, Vol. 29, pp. 245-267.
6. ORREGO, R., *et al.* 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.
7. 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.
8. XAVIER, C. e CHAMORRO, S. e VIDAL, G. Chronic effects of Kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2005, Vol. 75, pp. 670-676.
9. XAVIER, C., *et al.* 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.