

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

LUCAS ALBERTO FERNANDES ALVES

**ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE CELULOSE
KRAFT SUBMETIDO A TRATAMENTO POR REATOR DE BIOFILME COM LEITO
MÓVEL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2013

LUCAS ALBERTO FERNANDES ALVES

**ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE CELULOSE
KRAFT SUBMETIDO A TRATAMENTO POR REATOR DE BIOFILME COM LEITO
MÓVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do curso de Bacharelado em Química, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Xavier

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCAS ALBERTO FERNANDES ALVES

ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE CELULOSE KRAFT SUBMETIDO A TRATAMENTO POR REATOR DE BIOFILME COM LEITO MÓVEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR e **APROVADO** pela seguinte banca:

Membro 1 – Prof. Dr. Marcus Vinícius de Liz
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Prof^a. Dr^a. Marlene Soares
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientadora - Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Xavier
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso - Prof^a. Dr^a. Danielle Caroline Schnitzler (UTFPR)

Curitiba, 1º de outubro de 2013.

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu eterno Pai, por Seu cuidado e direção na minha vida; por ter me sustentado até este momento, em meio a tantas responsabilidades e desafios.

Também agradeço à minha família por seu apoio durante minha jornada acadêmica: a meus pais Alberto e Dirce, me incentivando a não desistir, especialmente nesse último ano em que se encontraram distantes geograficamente de mim; à minha irmã Tamiris, por ter resistido a todos os meus surtos quando minha tensão se acumulava; e à minha avó Lourdes, por ter me ajudado todos esses anos com as despesas de locomoção.

Agradeço aos meus diversos colegas de graduação por estarem comigo nos momentos de diversão e de tensão acadêmica. A vida, em muitas vezes, não permitiu que nossos passos continuassem a coincidir, mas as boas memórias com certeza permanecem.

Agradeço à minha orientadora Claudia, por seu enorme carinho e simpatia, sempre dando grande ajuda no desenvolvimento das atividades e na produção científica. Estendo meu agradecimento também aos colegas de trabalho do GTEF, desde aqueles tempos em que o grupo não tinha nome até os de hoje – Teffy, Milene, Suelen, Camila, Raquel, Osmar, Luiz e demais pessoas – pela ajuda e companheirismo nas atividades dentro e fora de laboratório.

Agradeço imensamente a todos aqueles que ajudaram para que esse trabalho se realizasse: à Suelen, por ceder o efluente utilizado neste trabalho, às Dras. Gladys e Soledad da equipe do Centro de Ciencias Ambientales da Universidad de Concepción, pela ajuda com a realização dos ensaios YES; à Tamires, ao Fabricio e ao Washington da Embrapa, pela tão esperada viabilização e realização das análises cromatográficas.

RESUMO

ALVES, Lucas A. F. **Atividade estrogênica em efluente de indústria de celulose kraft submetido a tratamento por reator de biofilme com leito móvel**. 2013. 48 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Tecnológica) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

Os efluentes gerados na produção da celulose podem conter compostos com atividades de interferência endócrina, podendo mimetizar hormônios naturais quando lançados nos corpos hídricos. Por conta disso, avaliou-se a ocorrência e remoção de atividade estrogênica em efluente de indústria de celulose kraft, tratado em um reator de biofilme com leito móvel (MBBR) submetido a quatro condições distintas. Para tal, usou-se das técnicas YES (*Yeast Estrogen Screen*) para avaliar a ocorrência de atividade estrogênica nas amostras analisadas e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) para verificar a presença de compostos específicos possivelmente associados ao efeito de atividade estrogênica. Observou-se melhor desempenho na remoção de atividade estrogênica quando o reator foi operado com cargas orgânicas volumétricas mais baixas (0,4 e 1,2 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹). Por outro lado, na operação com cargas orgânicas volumétricas mais altas (4,0 e 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹) essa remoção não se verificou nos extratos analisados. Os resultados das análises cromatográficas indicaram a presença de ácidos resínicos no afluente do reator MBBR, em específico nos extratos de acetato de etila e de hexano.

Palavras-chave: Efluente de indústria de celulose kraft. Atividade estrogênica. Reator de biofilme com leito móvel. MBBR.

ABSTRACT

ALVES, Lucas A. F. **Estrogenic activity in kraft pulp mill effluent treated by moving bed biofilm reactor.** 2013. 48 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Tecnológica) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

The effluents discharged by pulp mill production may release endocrine disruptor compounds, which can mimetize natural hormones in watercourses. Due to that, it was evaluated the fate and removal of estrogenic in kraft pulp mill effluent, treated by a moving bed biofilm reactor (MBBR) at four different conditions. It was used the YES (Yeast Estrogen Screen) assay to verify the occurrence of estrogenic activity in analyzed samples, and gaseous chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS) to verify the presence of specific compounds, which may be possibly related to estrogenic activity. It was observed better performance on estrogenic activity removal when the reactor was operated at low organic load rates (0.4 and 1.2 g_{COD}.L⁻¹.d⁻¹). Otherwise, at higher organic load rates (4.0 and 9.0 g_{COD}.L⁻¹.d⁻¹), it was not observed removal of estrogenic activity. The results of chromatographic analysis indicated the presence of resin acids in sample extracts of ethyl acetate and hexane from the affluent of MBBR reactor.

Keywords: Kraft pulp mill effluent. Estrogenic activity. Moving bed biofilm reactor. MBBR.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Associações químicas na parede celular vegetal..... | 13 |
| Figura 2 – Processo de produção da polpa celulósica. | 14 |
| Figura 3 – Processos unitários empregados pela indústria de celulose e papel para tratamento de efluentes. | 17 |
| Figura 4 – Representação de um reator MBBR de sistema aeróbio. | 19 |
| Figura 5 – Meios suporte na forma de cilindro (a) e de discos (b)..... | 20 |
| Figura 6 – Processos de desregulação endócrina: (a) resposta natural; (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista..... | 21 |
| Figura 7 – Esquema do sistema de expressão de estrogênio na levedura. | 25 |
| Figura 8 – Reação de decomposição do CPRG mediada pela enzima β -galactosidase. | 25 |
| Figura 9 – Gráfico da curva logística, conforme os parâmetros da Equação 2. | 28 |
| Figura 10 – Curvas e imagens da amostra do efluente não tratado submetido ao ensaio YES: extratos de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano. | 32 |
| Figura 11 – Curvas e imagens do efluente tratado por MBBR na COV 4,0 g _{DQO} .L ⁻¹ .d ⁻¹ submetido ao ensaio YES: extratos de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano..... | 34 |
| Figura 12 – Curvas e imagens da amostra de saída do reator MBBR operado à COV 9,0 g _{DQO} .L ⁻¹ .d ⁻¹ submetida ao ensaio YES: extratos de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano. | 35 |
| Figura 13 – Curva dose-resposta para o padrão EE2. | 36 |
| Figura 14 – Cromatograma obtido para o extrato de acetato de etila do afluente do reator MBBR. | 39 |
| Figura 15 - Cromatograma obtido para o extrato de hexano do afluente do reator MBBR..... | 39 |
| Figura 16 – Espectros de massa para o ácido abiético derivatizado: experimental (a) e do banco de dados do NIST (b)..... | 41 |
| Figura 17 – Espectros de massa para o ácido deidroabiético derivatizado: experimental (a) e do banco de dados do NIST (b)..... | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Características da poluição aquosa ao longo da produção da polpa de celulose kraft. | 16 |
| Tabela 2 – Carga típicas em efluentes de indústrias de celulose kraft não tratados. | 16 |
| Tabela 3 – Propriedades físico-químicas importantes na dinâmica dos EDCs. | 21 |
| Tabela 4 – Propriedades físico-químicas de compostos desreguladores endócrinos. | 23 |
| Tabela 5 – Valores de EQ-EE2 para as amostras do reator MBBR. | 37 |
| Tabela 6 – Análise estatística dos dados estimados de EQ-EE2. | 37 |
| Tabela 7 – Resumo das observações dos cromatogramas obtidos para as amostras do reator MBBR. | 38 |
| Tabela 8 – Compostos identificados nos extratos do afluente do reator MBBR. | 40 |

LISTA DE ABREVIações

- Bracelpa - Associação Brasileira de Papel e Celulose
- BSTFA - N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
- CEMA - Conselho Estadual do Meio Ambiente
- CFT - Compostos fenólicos totais
- CG-EM - Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- COV - Carga orgânica volumétrica
- CPRG - *Chlorophenol red β -D-galactopyranoside*
- DBO - Demanda bioquímica de oxigênio
- DQO - Demanda química de oxigênio
- ECF - *Elemental chlorine free*
- EDC - *Endocrine disrupter compound*
- ERE - *Estrogen response element*
- hER - *Human estrogen receptor*
- MBBR - *Moving bed biofilm reactor*
- NIST - *National Institute of Standards and Technology*
- SS - Sólidos suspensos
- TCF - *Totally chlorine free*
- YES - *Yeast Estrogen Screen*

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 11 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 3.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE KRAFT | 12 |
| 3.1.1 Dados do setor da indústria de celulose | 12 |
| 3.1.2 Matéria-prima e componentes | 12 |
| 3.1.3 Processo industrial | 13 |
| 3.1.4 Característica do efluente gerado | 15 |
| 3.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES | 17 |
| 3.2.1 Reator de biofilme com leito móvel (MBBR) | 18 |
| 3.3 DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA | 20 |
| 3.3.1 Ocorrência de EDCs em efluentes da indústria de celulose kraft | 22 |
| 3.3.2 Atividade estrogênica | 24 |
| 4 METODOLOGIA | 26 |
| 4.1 OCORRÊNCIA DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA NO EFLUENTE | 26 |
| 4.1.1 Ensaio YES | 26 |
| 4.2 REMOÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA PELO TRATAMENTO COM REATOR MBBR | 27 |
| 4.2.1 Comparação de efeitos entre afluente e efluente do reator MBBR | 28 |
| 4.3 ORIGEM DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA | 29 |
| 4.3.1 Análise por GC-EM | 29 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 31 |
| 5.1 OCORRÊNCIA DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA NO EFLUENTE | 31 |
| 5.2 REMOÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA PELO TRATAMENTO COM REATOR MBBR | 33 |
| 5.2.1 Comparação de efeitos com o padrão EE2 | 36 |
| 5.3 ORIGEM DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA NO EFLUENTE | 38 |
| 5.3.1 Resultado das análises cromatográficas | 38 |
| 5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS | 42 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| 6 CONCLUSÕES..... | 44 |
| REFERÊNCIAS..... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

O processo produtivo da indústria de celulose kraft tem como uma de suas características o alto volume de água consumido, o que promove a geração de grande quantidade de efluente líquido. Nele está presente uma variedade de compostos químicos, tais como os lignínicos e seus derivados, fitoesteróis, ácidos resínicos, ácidos graxos, entre outros; estes conferem recalcitrância e alta carga orgânica no efluente, bem como toxicidade aos organismos presente no meio aquático (XAVIER, 2006).

Dentre as formas de efeitos deletérios associadas aos compostos presentes no efluente, pode-se mencionar aquelas que envolvem a desregulação endócrina dos organismos aquáticos em corpos receptores. Esses compostos podem atuar reciprocamente com os receptores hormonais, mimetizando ou bloqueando a ação de hormônios naturais referentes a diversos processos biológicos, como reprodução, crescimento e desenvolvimento (HAMM *et al.*, 2007).

Os sistemas de tratamentos biológicos já se mostraram capazes de promover a remoção de compostos específicos. No caso de compostos causadores de desregulação endócrina, observou-se sua remoção em sistemas tradicionais, como lagoas aeradas e lodos ativados (XAVIER *et al.*, 2009), e também em reatores de biomassa aderida, tal como o reator de biofilme com leito móvel (MBBR) (CHAMORRO *et al.*, 2010a). A eficiência de remoção, nesses casos, está condicionada aos parâmetros de operação desses sistemas, como a carga orgânica aplicada, o tempo de detenção hidráulica e as características da microbiota envolvida (KOH *et al.*, 2008).

Assim, teve-se como objetivo avaliar (i) a ocorrência de atividade estrogênica em efluente da indústria de celulose kraft, através do ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*); (ii) a remoção de atividade estrogênica através do tratamento desse efluente por um reator MBBR; e (iii) a origem dessa atividade através da análise cromatográfica de extratos do afluente e do efluente do reator MBBR em três solventes: metanol, acetato de etila e hexano.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência, a remoção e a origem da atividade estrogênica em efluente de indústria de celulose kraft submetido a tratamento por reator de biofilme com leito móvel (MBBR).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente de celulose kraft quanto à ocorrência de atividade estrogênica pelo ensaio YES;
- Avaliar a remoção de atividade estrogênica para diferentes cargas orgânicas volumétricas aplicadas a um reator MBBR tratando efluente da indústria de celulose kraft a 0,4; 1,2; 4,0 e 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹;
- Verificar a presença de compostos perturbadores endócrinos como estigmasterol, β-sitosterol, ácido abiético e ácido deidroabiético nas amostras de afluente e efluente do reator MBBR por CG-EM.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE KRAFT

3.1.1 Dados do setor da indústria de celulose

O setor industrial de produção de celulose e papel tem se tornado um dos mais expressivos na economia do Brasil, alcançando o posto de 4º maior produtor com 13.922 toneladas produzidas no ano de 2011. Segundo dados da Associação Brasileira de Papel e Celulose (Bracelpa), existem 220 empresas com atividade em 540 municípios, localizados em 18 estados, gerando 128 mil empregos diretos nas áreas florestal e industrial e mais 575 mil empregos indiretos. Além disso, o setor tem sido alvo de investimentos de US\$ 12 bilhões nos últimos 10 anos (BRACELPA, 2013).

No Brasil, a base florestal do setor de celulose e papel consiste majoritariamente em eucalipto (81,2% do total de florestas plantadas) e pinus (18,4%) (BRACELPA, 2011). A partir do eucalipto se obtém a celulose de fibra curta (de 0,8 a 1,2 mm), que é destinada para a produção de papel de impressão e de fins sanitários; enquanto do pinus se obtém a celulose de fibra longa (de 3 a 5 mm), mais adequada para papéis de embalagem e cartões por conta de sua maior resistência mecânica (BRASIL, 2007; VANZETTO, 2012).

3.1.2 Matéria-prima e componentes

A principal matéria-prima para a produção de celulose é a madeira, que pode ser definida como um biopolímero tridimensional formado por redes interligadas de celulose, hemicelulose e lignina, além de quantidades minoritárias de extrativos e compostos inorgânicos (ROWELL *et al.*, 2012).

A celulose, que compõe aproximadamente 45% do peso seco da madeira, é um polímero linear constituído apenas por unidades de glicose ligadas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas. A hemicelulose corresponde de 25 a 30% do peso seco da madeira, e engloba um grupo heterogêneo de polissacarídeos, de peso molecular menor que a celulose e que podem ser constituídos por unidades de glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, ácidos 4-O-metilglucurônico, galacturônico e glucurônico

(PÉREZ *et al.*, 2002). A lignina compõe entre 18 e 35% do peso seco da madeira, sendo ela um polímero de estrutura complexa, cuja estrutura se baseia em unidades fenil-propano ligadas de diferentes maneiras entre si (CARVALHO *et al.*, 2009). A associação dessas substâncias na estrutura da madeira é mostrada na Figura 1.

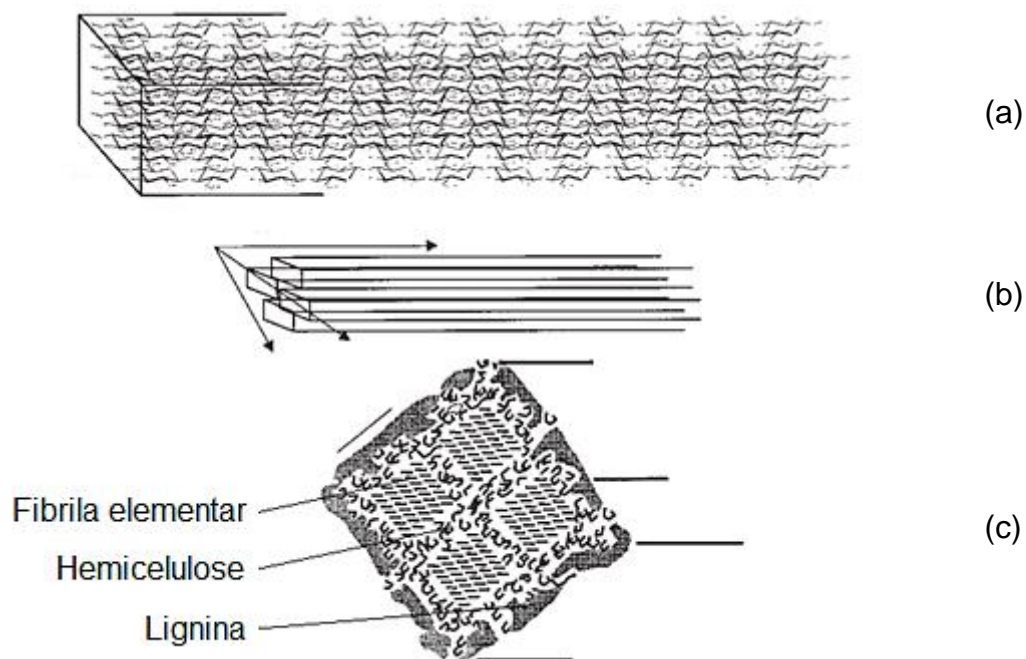


Figura 1 – Associações químicas na parede celular vegetal.

Fonte: adaptado de CARVALHO *et al.* (2009).

Além desses componentes, existem outras substâncias presentes na madeira, como gorduras, ácidos graxos, álcoois graxos, fenóis, terpenos, esteróis, ácidos resínicos, ceras, entre outras. Essas substâncias são classificadas como extrativos, devido à capacidade de serem extraídas da madeira por ação de solventes, representam entre 5 e 7% de sua composição e têm a propriedade de conferir cor, cheiro e durabilidade à madeira (ROWELL *et al.*, 2012).

3.1.3 Processo industrial

O processo industrial de formação da polpa celulósica, a polpação, tem por objetivo fazer a separação das fibras de celulose dos demais constituintes da madeira, por via mecânica e/ou por via química. Essa é a primeira etapa do processo de produção do papel, sendo sucedida pela conversão da polpa no papel propriamente

dito (BAJPAI, 2011). Um diagrama com as principais etapas do processo de polpação é apresentado na Figura 2.

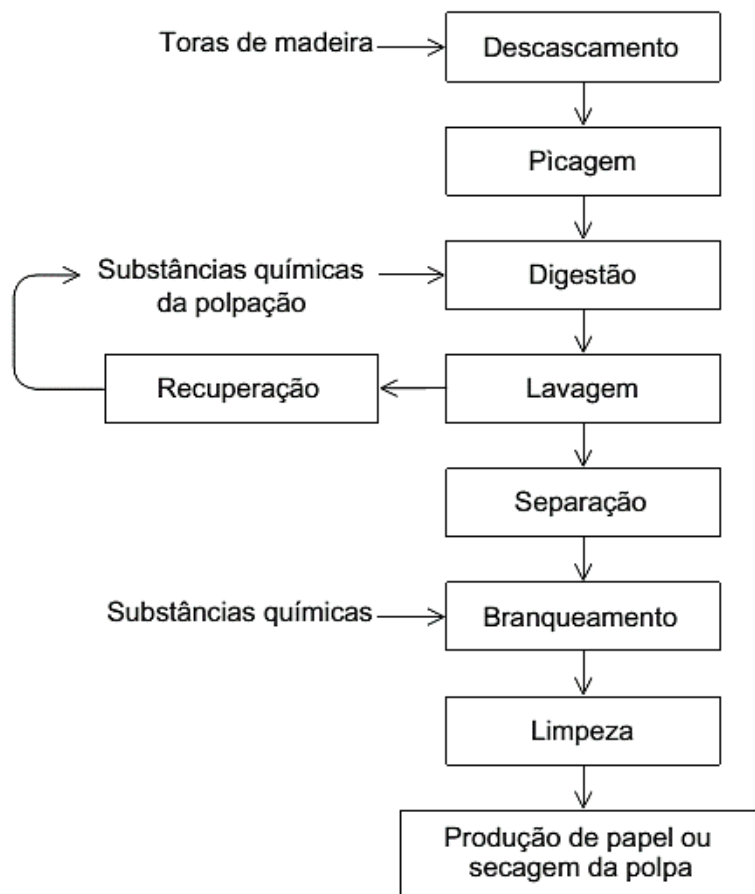


Figura 2 – Processo de produção da polpa celulósica.

Fonte: BAJPAI (2011).

Após a colheita da madeira, é feito seu descascamento para evitar que a casca e as sujeiras a ela associadas entrem no processo. Em seguida, a madeira é submetida a fragmentação com o objetivo de se obterem unidades menores, chamadas cavacos, cujas dimensões devem ser favoráveis ao processo de polpação (BAJPAI, 2011).

A separação das fibras de celulose, para formação da polpa, pode se dar de três diferentes maneiras: por polpação mecânica, quimiomecânica e química. Na polpação mecânica, as fibras são separadas por ação de forças mecânicas e/ou por vias térmicas; enquanto na polpação química, se faz a dissolução da lignina através de reações químicas, buscando preservar as fibras de celulose. No processo

quimiomecânico, as fibras são separadas por ação tanto mecânica quanto de agentes químicos (WALKER, 2006).

O processo kraft é amplamente utilizado, correspondendo a 91% da polpação química e a 75% de toda a produção mundial de polpa. Isso se deve a diversos motivos: (i) possui um excelente sistema de recuperação; (ii) pode ser usado com qualquer tipo de madeira; (iii) possui tempo de cozimento curto; (iv) a polpa produzida é bastante forte e (v) sua planta de produção pode ser totalmente autossuficiente em energia (WALKER, 2006; BAJPAI, 2011).

No processo kraft, os cavacos de madeira são submetidos a um reator contendo hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio (Na₂S), mistura essa chamada de licor branco. Os cavacos são cozidos por um período de 2 a 5 horas, a uma temperatura entre 170-175°C e pressão entre 6,9-9,3 bar. O rendimento do processo de polpação é de 65-70% para a polpa escura, de 47-50% para polpas branqueáveis e de 43-45% após o processo de branqueamento (SUMATHI e HUNG, 2010).

A polpa produzida pelo processo kraft é muitas vezes escura demais para ser usada na produção de papel, tendo em vista suas diversas finalidades. Nesses casos, se faz necessária uma etapa de branqueamento, para fazer a remoção da lignina residual presente nas fibras de celulose, que causa o escurecimento da polpa. Os processos de branqueamento mais comuns são aqueles que utilizam cloro elementar (Cl₂), os processos livres de cloro elementar (ECF), que fazem uso de dióxido de cloro, e os processos totalmente livres de cloro (TCF), que fazem uso de peróxido de hidrogênio, oxigênio e/ou ozônio (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2009).

3.1.4 Característica do efluente gerado

A indústria de celulose kraft consome grande quantidade de água em seu processo produtivo, entre 40 e 55 m³.t⁻¹ de celulose seca ao ar (BACHMANN, 2009); o que leva, de maneira proporcional, à geração de grande quantidade de efluente líquido. Dentre os diversos processos envolvidos na produção da polpa desta celulose, as principais fontes de poluição são as etapas de preparação da madeira, polpação, lavagem e branqueamento da polpa, como se apresenta na Tabela 1.

Tabela 1 - Características da poluição aquosa ao longo da produção da polpa de celulose kraft.

| Etapa geradora | Atividades realizadas | Natureza da poluição |
|-----------------------|--|---|
| Preparação da madeira | Descascamento e picagem, lavagem dos cavacos | Casca, resíduos do processamento, SS, DBO, cor, ácidos resínicos |
| Polpação | Digestão dos cavacos, condensados da evaporação do licor negro | Alta DBO, cor, pode conter compostos sulfurados reduzidos, ácidos resínicos |
| Lavagem | Separação, espessamento e operações de limpeza | Grande volume de água com SS, DBO e cor |
| Branqueamento | Reação da polpa com cloro elementar ou compostos de cloro | DBO, cor, compostos orgânicos clorados, ácidos resínicos |

Fonte: adaptado de SUMATHI e HUNG (2010).

O efluente gerado têm por característica altas concentrações de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos (SS), cor e toxicidade. Os valores típicos de alguns desses parâmetros, antes de serem submetidos a tratamento, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Carga típicas em efluentes de indústrias de celulose kraft não tratados.

| Tipo de polpa | Carga de efluente (m³.t⁻¹) | DQO (kg.t⁻¹) | DBO (kg.t⁻¹) | SS (kg.t⁻¹) |
|----------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Não branqueada | 20-60 | 20-30 | 5-10 | 12-15 |
| Branqueada | 60-100 | 60-120 | 18-25 | 12-18 |

Fonte: adaptado de KESKITALO e LEIVISKÄ (2010).

A DBO presente nesse efluente está associada a compostos prontamente biodegradáveis, como carboidratos e ácidos orgânicos. Já a cor e a toxicidade estão relacionadas com a presença de compostos lignínicos e seus derivados fenólicos de alto peso molecular. Além disso, extrativos como ácidos resínicos e fitoesteróis também são responsáveis pela toxicidade do efluente. Todos estes compostos conferem recalcitrância e alta carga orgânica no efluente, bem como efeitos deletérios aos organismos presente no meio aquático (XAVIER, 2006; ORREGO *et al.*, 2010).

3.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES

Visando a se adequar aos limites de lançamento estabelecidos pela legislação, tais como a Resolução n° 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a Resolução n° 081/2010 do Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA), as plantas industriais fazem uso de tecnologias de tratamento para redução dos valores de parâmetros relacionado a impactos ambientais, como DQO, DBO, cor, toxicidade, entre outros (PARANÁ, 2010; BRASIL, 2011).

Apresenta-se na Figura 3 um fluxograma, no qual se apresenta as principais etapas do tratamento realizado em indústrias de celulose e papel, bem como os processos mais comumente utilizados de cada uma delas.

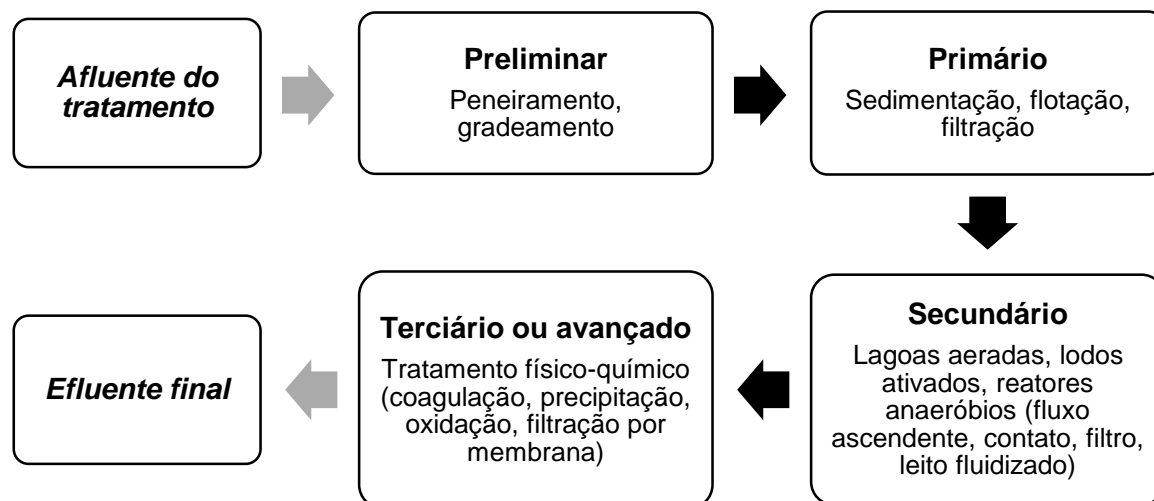


Figura 3 – Processos unitários empregados pela indústria de celulose e papel para tratamento de efluentes.

Fonte: adaptado de SUMATHI e HUNG (2010).

Dentre os tipos de tratamento utilizados na indústria de celulose e papel, se destacam os físico-químicos e os biológicos. Os processos físico-químicos, tais como separação por membrana, coagulação e precipitação química, são bastante empregados para a remoção de sólidos dissolvidos, matéria orgânica recalcitrante, cor e sais (SUMATHI e HUNG, 2010). Nos processos biológicos, consórcios de microrganismos fazem a degradação da matéria orgânica biodegradável, simulando processos naturais de autodepuração que ocorrem nos cursos d'água. Esses sistemas, porém, operam sob condições controladas, como carga orgânica aplicada

e tempo de detenção hidráulica, gerando assim altas taxas de conversão (VON SPERLING, 2007).

Dentre os processos de tratamento biológicos, os mais comuns usados no tratamento de efluentes da indústria de celulose e papel são os lodos ativados, as lagoas aeradas (ambos sistemas aeróbios) e reatores anaeróbios. Os sistemas aeróbios têm como vantagem as altas taxas de conversão de matéria orgânica, porém os sistemas anaeróbios requerem menor consumo de energia, uma vez que não necessitam de aeração, e geram menor quantidade de lodo por quantidade de matéria transformada (SUMATHI e HUNG, 2010; VANZETTO, 2012).

Nos processos aeróbios de biodegradação, a microbiota envolvida é constituída principalmente de bactérias e protozoários, podendo-se encontrar também fungos e rotíferos. Uma propriedade desses microrganismos, interessante para o tratamento de águas residuárias, é a de se apresentarem no meio líquido aglomerados em estruturas como flocos, biofilmes e grânulos. Assim, os processos de tratamento biológico que podem ser classificados como sistemas com crescimento disperso são as lagoas de estabilização e os lodos ativados, enquanto nos sistemas com crescimento aderido se classifica o reator de biofilme com leito móvel (VON SPERLING, 2007).

3.2.1 Reator de biofilme com leito móvel (MBBR)

O sistema MBBR foi desenvolvido no início da década de 1990 na Noruega, numa busca de ampliar a capacidade de tratamento das estações de tratamento de esgoto de pequeno porte, bem como projetar estações de elevada capacidade de tratamento porém com dimensões compactas. Por isso, em uma parceria da empresa norueguesa *Kaldnes Miljøteknologi A/S* com a Universidade da Noruega, estudou-se a associação dos processos de biomassa aderida e em suspensão num único sistema, originando assim o MBBR.

O MBBR é um sistema de fluxo contínuo que faz uso de meios suporte de polietileno de alta densidade para disponibilizar superfície de adesão para a biomassa microbiana. Os meios suporte são mantidos em circulação pelo reator com auxílio de um misturador ou de um sistema de aeração, para se manter contato em toda a massa líquida (MINEGATTI, 2008). Um esquema representando sua operação é mostrado na Figura 4.

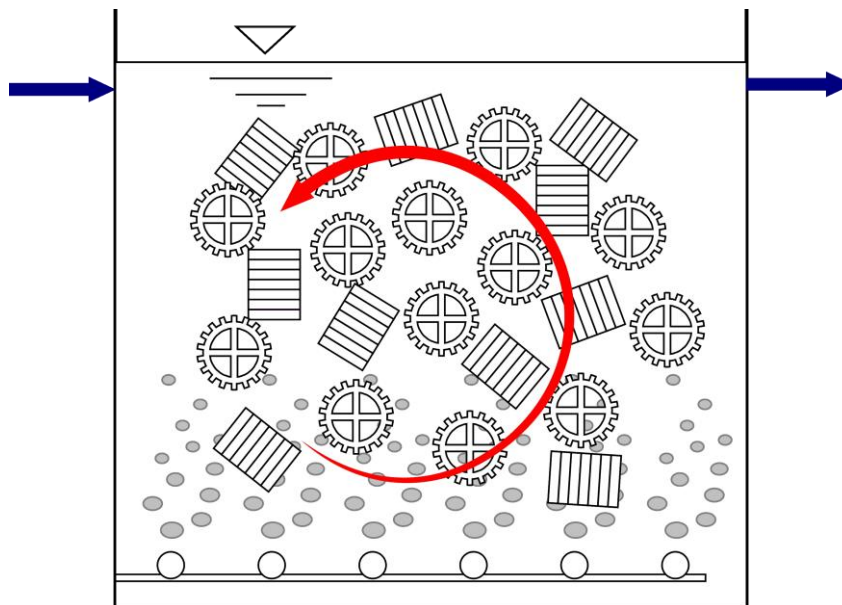


Figura 4 – Representação de um reator MBBR de sistema aeróbio.

Fonte: VEOLIA (2013).

Esse sistema permite manter uma alta concentração de biomassa ativa, comparativamente com o sistema de lodos ativados, sem que haja aumento das dimensões do reator. Além disso, ele é resistente a picos de carga orgânica e hidráulica, bem como a variações de pH e temperatura (BRINKLEY *et al.*, 2007; MINEGATTI, 2008).

Os meios suporte existem na forma de cilindros ou de discos (Figura 5), possuindo corrugações externas e divisões internas para promover uma maior área superficial de aderência da biomassa, e evitando o cisalhamento da mesma. No mercado, se encontram meios suporte com área superficial específica variando de 350 a 1000 m².m⁻³. O volume de meios suporte a serem inseridos em um reator devem estar numa faixa de 20% a 70% do volume total deste, que favorece o balanceamento entre uma oxigenação eficiente do sistema e uma hidrodinâmica energeticamente viável (MINEGATTI, 2008).

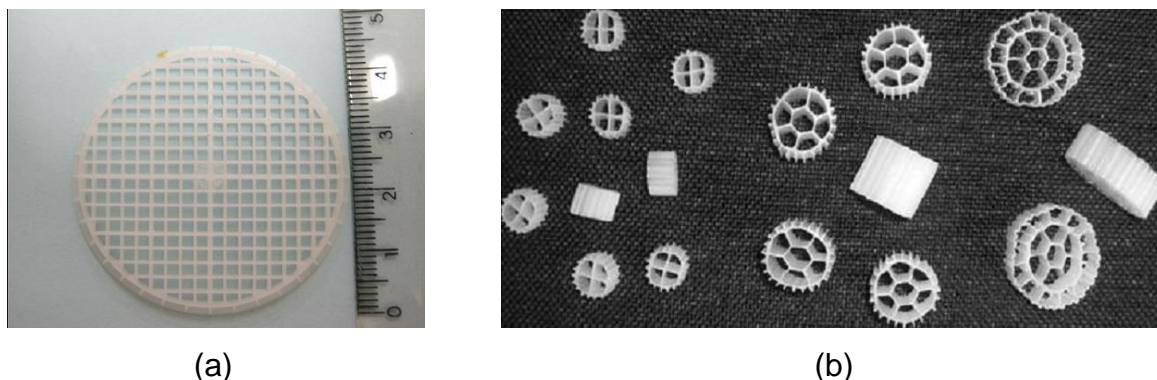


Figura 5 – Meios suporte na forma de cilindro (a) e de discos (b).

Fonte: MINEGATTI (2008).

3.3 DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA

Diversos contaminantes ambientais, quando lançados em um corpo hídrico, podem afetar o sistema endócrino de espécies aquáticas. O sistema endócrino é composto por diversas glândulas ao longo do corpo, responsáveis pela síntese de hormônios com as mais diversas funções. Os hormônios sintetizados são conduzidos aos órgãos-alvo pela corrente sanguínea, onde interagem com receptores presentes nas células, produzindo a resposta desejada (Figura 6a) (BIRKETT e LESTER, 2010).

Substâncias ou misturas exógenas que podem interferir nesse processo são chamadas de desreguladores endócrinos (EDC). Sua ação pode acontecer de duas maneiras: por efeito agonista, quando ocorre a mimetização da ação de hormônios endógenos (Figura 6b) ou por efeito antagonista, quando há inibição de sua ação (Figura 6c). Por conta dessa interferência, esses compostos podem causar problemas na determinação de características sexuais e no comportamento das espécies por eles afetadas (NOGUEIRA, 2003).

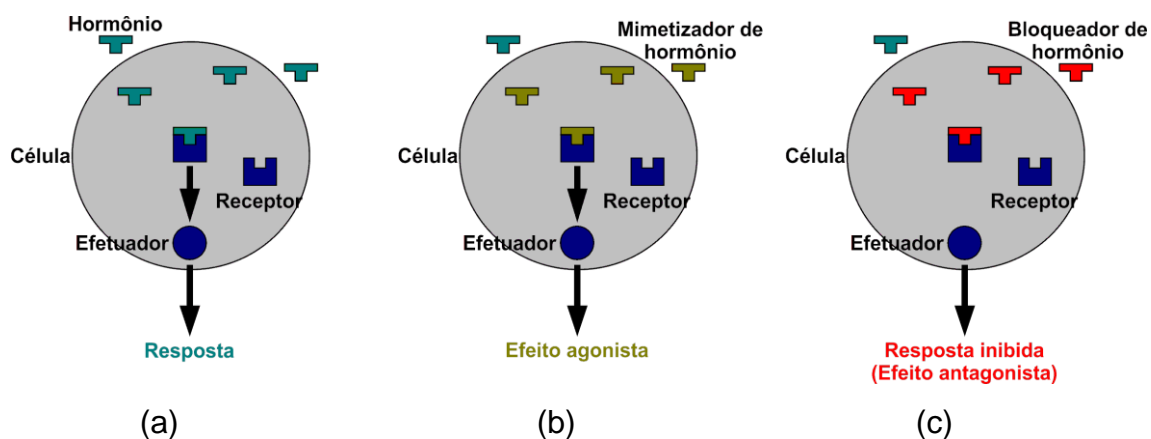


Figura 6 – Processos de desregulação endócrina: (a) resposta natural; (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista.

Fonte: BIRKETT e LESTER (2010).

A dinâmica de um EDC num corpo d'água – estando ele dissolvido, adsorvido em sedimentos ou bioacumulado em organismos – é influenciada por suas propriedades físico-químicas. As propriedades relevantes para se inferir seu comportamento são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas importantes na dinâmica dos EDCs.

| Propriedade físico-química | Potencial | Baixo | Moderado | Alto |
|---|---|------------|---------------------|------------|
| Solubilidade em água | Dissolução (mg.L^{-1}) | <1 | - | 1000 |
| Constante da lei de Henry | Evaporação ($\text{atm.m}^3.\text{mol}^{-1}$) | $>10^{-2}$ | $10^{-2} - 10^{-7}$ | $<10^{-7}$ |
| Coeficiente de partição de carbono orgânico | Adsorção ($\log K_{oc}$) | <3 | - | >3 |
| Coeficiente de partição octanol/água | Bioconcentração ($\log K_{ow}$) | <2,5 | 2,5 - 4,0 | >4,0 |

Fonte: BIRKETT e LESTER (2010).

Os EDCs podem ter comportamento estrogênico ou androgênico, dependendo do efeito observado sobre a biota. De maneira geral, compostos estrogênicos conferem efeitos de feminização ao organismo, enquanto compostos androgênicos conferem efeitos de masculinização (BIRKETT e LESTER, 2010).

3.3.1 Ocorrência de EDCs em efluentes da indústria de celulose kraft

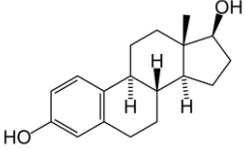
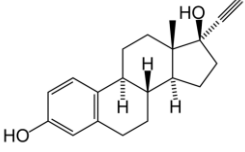
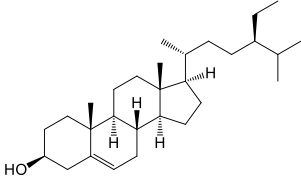
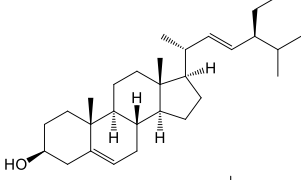
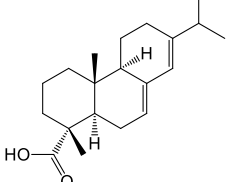
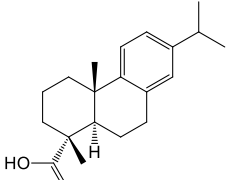
O efluente gerado por indústrias de celulose kraft não tratado possui características de desregulação endócrina, afetando a fisiologia reprodutiva de peixes expostos de alguma forma a ele. Assim, com o intuito de se elucidar os agentes causadores, tem-se dado atenção à presença dos extrativos da madeira, por conta dos efeitos de toxicidade já conhecidos desses compostos. Se observou que, em geral, os principais responsáveis pela desregulação endócrina estão contidos nos extrativos da madeira, principalmente os ácidos resínicos e os fitoesteróis (CHRISTIANSON-HEISKA e ISOMAA, 2008; ORREGO *et al.*, 2010).

No grupo dos ácidos resínicos, se encontram o ácido abiético e o deidroabiético. O ácido abiético se mostrou estrogênico em células de câncer de mama, enquanto em peixes sua indução de atividade hormonal foi bastante fraca (MELLANEN *et al.*, 1996). O ácido deidroabiético, por sua vez, teve sua ação relacionada a uma variedade de alterações em hepatócitos de peixes, como redução nos níveis de cortisol em plasma de enguias e de vitelogenina em plasma de peixe-zebras (ORREGO *et al.*, 2010).

No grupo dos fitoesteróis, se encontram os compostos β -sitosterol e o estigmasterol. Para o β -sitosterol, observou-se efeitos como alteração nos níveis plasmáticos de hormônios sexuais, produção de esteróis e indução de vitelogenina em peixes-dourado e em trutas-arco-íris (HEWITT *et al.*, 2008). Ao estigmasterol se atribuiu efeitos como redução dos níveis de colesterol em plasma e inibição de síntese hepática e de absorção intestinal em ratos (BATTA *et al.*, 2006).

Apresenta-se na Tabela 4 as propriedades físico-químicas dos compostos citados, bem como as do estradiol (estrógeno natural feminino) e do etinilestradiol (estrógeno sintético, usado como padrão de atividade estrogênica).

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas de compostos desreguladores endócrinos.

| Composto | Fórmula estrutural | Massa molar (g.mol ⁻¹) | Solubilidade (mg.L ⁻¹) | Constante da lei de Henry (atm.m ³ .mol ⁻¹) | log K _{ow} |
|----------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|--|---------------------|
| Estradiol |  | 272,39 | 3,6 (27°C) | 3,64.10 ⁻¹¹ (25°C) | 4,01 |
| Etinilestradiol |  | 296,41 | 11,3 (27°C) | 7,94.10 ⁻¹² (25°C) | 3,67 |
| β-sitosterol |  | 414,72 | 1,3.10 ⁻⁵ (25°C) | 2,95.10 ⁻⁴ (25°C) | 9,65 |
| Estigmasterol |  | 412,71 | 1,12.10 ⁻⁵ (25°C) | 2,59.10 ⁻⁴ (25°C) | 9,43 |
| Ácido abiético |  | 302,46 | 48,4 (20°C) | 6,76.10 ⁻⁶ (25°C) | 6,46 |
| Ácido deidroabiético |  | 300,44 | 6,6 | 1,78.10 ⁻⁷ (25°C) | 4,80 |

Fonte: PHYSPROP (2000).

3.3.2 Atividade estrogênica

No que se refere a compostos com atividade estrogênica, estes podem ser assim classificados quando, segundo Birkett e Lester (2010), sua ação promove a reprodução de células de órgãos sexuais femininos, promove hipertrofia ou aumento do tamanho de uma célula, tal como nas mamas femininas e nos músculos masculinos durante a puberdade, ou inicia a síntese de proteínas específicas, estimulando dessa maneira o crescimento de tecidos. Por conta disso, ao ocorrer o despejo desses compostos em corpos hídricos, podem-se observar diversos efeitos sobre a biota aquática, como a feminização de peixes devido ao aumento dos níveis de vitelogenina no plasma e da presença de ovócitos nos testículos desses organismos (SUMPTER e JOBLING, 2013).

A maioria dos estrógenos ambientais compete com o estradiol, que é o hormônio sexual feminino natural, pelo receptor de estrogênio. A estrutura do receptor de estrogênio não é especificamente seletiva, o que resulta em uma diversidade de ações agonistas causadas por compostos de diferentes estruturas, diferindo o nível de afinidade destas com o receptor (BIRKETT e LESTER, 2010; MILLA *et al.*, 2011).

A ocorrência de atividade estrogênica em uma amostra pode ser analisada através de bioensaios. Dentre eles, se encontra o ensaio YES (do inglês, *Yeast Estrogen Screen*), que se baseia na capacidade desses compostos se ligarem aos receptores de estrogênio humano inseridas em células de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 7). O gene receptor de estrogênio humano (hER) está integrado no genoma principal da levedura, sendo expresso numa forma capaz de se ligar aos elementos de resposta de estrogênio (ERE). A ativação do receptor causa a expressão do gene repórter *Lac-Z*, produzindo a enzima β -galactosidase (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

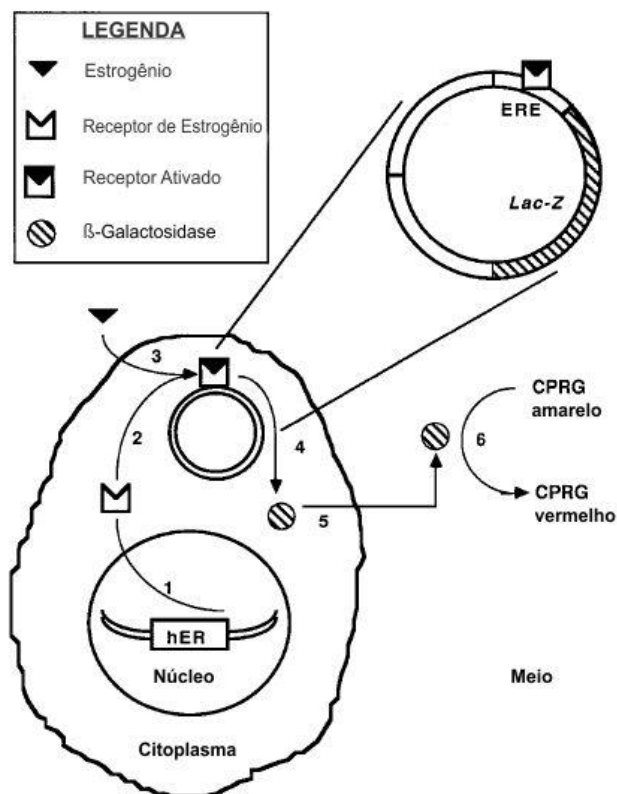


Figura 7 – Esquema do sistema de expressão de estrogênio na levedura.

Fonte: ROUTLEDGE e SUMPTER (1996).

A enzima β -galactosidase é liberada da célula para o meio, onde é capaz de degradar o substrato cromogênico vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo, CPRG (Figura 8), cujo produto pode ser medido por absorvância a 570 nm. Assim, a intensidade dessa reação colorimétrica está diretamente relacionada com a quantidade de compostos interagentes com o receptor de estrogênio na amostra analisada.

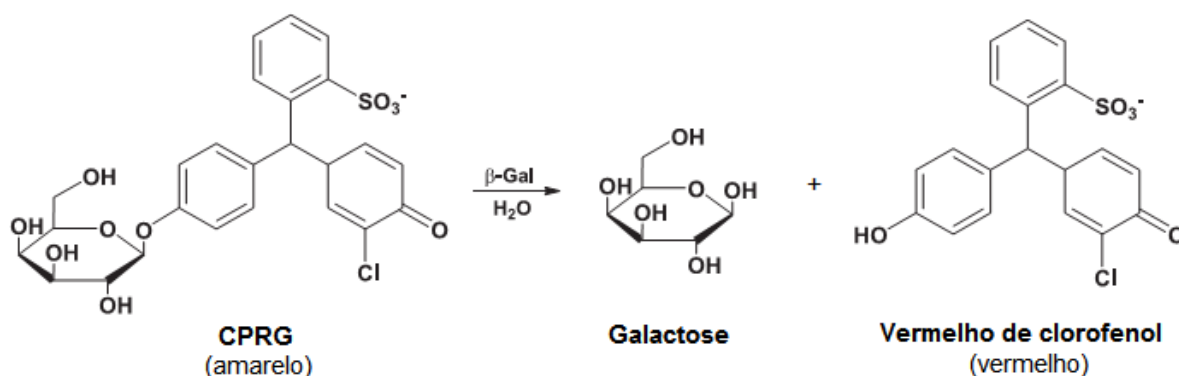


Figura 8 – Reação de decomposição do CPRG mediada pela enzima β -galactosidase.

Fonte: adaptado de DIAS *et al.* (2009).

4 METODOLOGIA

O efluente utilizado neste trabalho 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. Este foi coletado antes do tratamento biológico, e foi armazenado a 4 °C e na ausência de luz.

4.1 OCORRÊNCIA DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA NO EFLUENTE

O efluente não tratado foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 µm, e a partir dele foram obtidos três extratos: de metanol, de acetato de etila e de hexano, com o objetivo de observar a distribuição da atividade estrogênica e presença dos compostos específicos conforme a polaridade do meio (CHAMORRO *et al.*, 2010b).

A preparação dos extratos foi feita por extração em fase sólida, em cartuchos HyperSep C18 (fase reversa) de 3 mL, gentilmente cedidos pelo professor Dr. Marcus Vinicius de Liz, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Os cartuchos foram previamente condicionados com 12 mL de água milli-Q 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 usando 10 mL de um dos três solventes (metanol, acetato de etila ou hexano). De cada extrato obtido, separou-se uma alíquota de 2 mL para análise cromatográfica (item 4.3), sendo os outros 8 mL destinados à análise de atividade estrogênica (item 4.1.1). Por fim, os extratos obtidos foram submetidos a secagem com fluxo de nitrogênio.

4.1.1 Ensaio YES

As amostras destinadas à análise de atividade estrogênica foram submetidas ao ensaio YES, com base na metodologia proposta por Routledge e Sumpter (1996). Foram preparadas primeiramente diluições 1:2 das amostras e do padrão, utilizando-se uma microplaca de 96 poços, sendo utilizado para cada um deles uma fileira da

placa. Adicionou-se 100 µL de etanol absoluto nos 12 poços da placa, menos no primeiro poço. Nesse se adicionou 200 µL de amostra. Do primeiro poço se transferiu 100 µL ao segundo poço, do segundo se transferiu 100 µL ao terceiro, e assim sucessivamente até o último poço da fileira. Para o padrão etinilestradiol (EE2) realizou-se a mesma operação, obtendo assim uma faixa de concentração de 54,48 µg.L⁻¹ a 26,61 ng.L⁻¹.

Retirou-se alíquotas de 10 µL de cada poço da placa de diluição e transferiu-se para outra placa, porém dessa vez em duplicata (ocupando assim duas fileiras dela para cada amostra); às fileiras de amostras intercalaram-se fileiras de branco contendo somente 10 µL de etanol. Em capela de fluxo laminar, adicionou-se aos poços 200 µL do meio de análise, contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada e o substrato cromogênico CPRG (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996), seguido de agitação em shaker por 2 minutos.

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 associada ao crescimento da levedura), 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, de amarelo (resultado negativo) para vermelho (resultado positivo).

Os valores de absorvância utilizados para obtenção dos resultados foram corrigidos conforme a Equação 1.

$$A_{\text{corr}} = A_{570,\text{amostra}} - (A_{630,\text{amostra}} - A_{630,\text{branco}}) \quad (1)$$

4.2 REMOÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA PELO TRATAMENTO COM REATOR MBBR

O efluente não tratado foi submetido, em laboratório, a um processo de tratamento biológico realizado em um reator MBBR (VANZETTO, 2012), em escala de bancada, com volume útil de 1 L e operado a quatro condições distintas de carga orgânica volumétrica (COV): 0,4; 1,2; 4,0 e 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹. Os tempos de detenção hidráulica associados a cada COV foram, respectivamente, 45, 20, 7 e 2 h.

Alíquotas do efluente tratado pelo reator MBBR foram recolhidas a cada condição de tratamento operada. Delas também se obtiveram extratos de metanol, acetato de etila e hexano, seguindo a metodologia de extração em fase sólida descrita anteriormente. Os extratos assim obtidos foram submetidos ao ensaio YES, e se avaliou a ocorrência de remoção de atividade estrogênica por comparação de efeitos entre efluente não tratado e tratado por MBBR.

4.2.1 Comparação de efeitos entre afluente e efluente do reator MBBR

A partir da curva padrão de EE2, com forma logística, usou-se a Equação 2 na avaliação da atividade estrogênica das amostras.

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

Na Equação 2, y corresponde ao valor de A_{corr} , expresso como porcentagem relativa à média da absorbância corrigida dos brancos; A_1 , à máxima indução da atividade estrogênica; A_2 , ao limite de detecção; x , à concentração do padrão ou ao fator de diluição da amostra; x_0 , à EC_{50} (concentração que causa efeito igual a 50% de indução da atividade estrogênica) e p , à inclinação da região mediana da curva. Esses parâmetros podem ser visualizados na Figura 9.

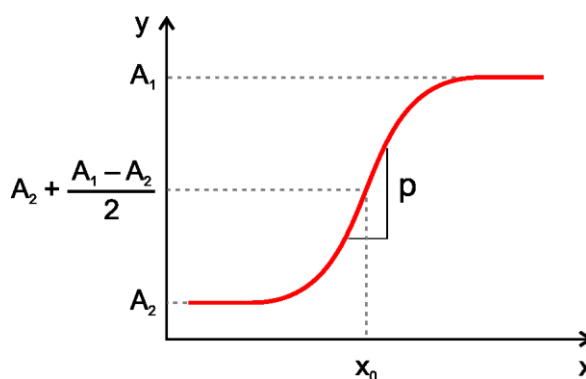


Figura 9 – Gráfico da curva logística, conforme os parâmetros da Equação 2.

A partir dos valores de EC_{50} obtidos do mesmo modo para as amostras, estimou-se a quantidade equivalente do padrão EE2 para se elucidar a mesma

resposta (EQ-EE2) através da Equação 3, com o objetivo de padronizar tais valores para efeito de comparação:

$$\text{EQ-EE2} = \frac{\text{EC}_{50,\text{padrão}}}{\text{EC}_{50,\text{amostra}}} \times 100 \quad (3)$$

A comparação estatística dos valores obtidos foi feita através do teste t de Student para amostras independentes, com auxílio do software Action para Microsoft Excel.

4.3 ORIGEM DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA

Analisou-se, nos extratos de afluente e efluente do reator MBBR destinados à análise cromatográfica, a presença de picos de interesse relacionados a fitoesteróis (estigmasterol e β -sitosterol) e ácidos resínicos (ácido abiético e ácido deidroabiético).

4.3.1 Análise por GC-EM

As amostras foram derivatizadas com adição de 50 μL de N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) ao extrato seco, deixando-se reagir a 70 °C durante 30 minutos. Após isso, foram secas com fluxo de nitrogênio, procedendo-se com a adição de 500 μL de hexano e agitação em um misturador vórtex.

As análises cromatográficas foram feitas de maneira automática (TripPlus AS, Thermo) em cromatógrafo gasoso (Focus GC, Thermo). 1 μL das amostras foram injetadas com divisão de fluxo (1 min), em split 1:10, e separadas em um coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm de espessura de filme, Thermo). Usou-se hélio como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e compensação a vácuo. A separação dos compostos foi feita com o injetor a uma temperatura de 280 °C e a linha de transferência a 290 °C. O forno foi programado a 70 °C, com uma isoterma de 4 min, seguido de aquecimento até 290 °C, a uma taxa de 3 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ e com uma isoterma final de 5 min, tendo-se assim uma corrida cromatográfica de 82 min (HELALEH *et al.*, 2001; PESSOA *et al.*, 2012).

Os analitos foram identificados a partir dos dados obtidos por espectrometria de massa com íon trap (Polaris Q, Thermo). O espectrômetro de massa foi operado

no modo positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, e com a fonte de íons a uma temperatura de 200°C (PESSOA *et al.*, 2012). Os dados assim obtidos foram analisados com o auxílio do programa Xcalibur (Thermo).

Segundo a literatura especializada, a expectativa para observar o pico base dos compostos de interesse derivatizados com BSTFA é de $m/z = 256$ para o ácido abiético, $m/z = 239$ para o ácido deidroabiético, $m/z = 129$ para o β -sitosterol e $m/z = 83$ para o estigmasterol (NIST, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OCORRÊNCIA DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA NO EFLUENTE

Nas amostras de efluente não tratado, pôde-se observar para os extratos de metanol e acetato de etila a tendência de formação de uma curva dose-resposta típica, com efeito de atividade estrogênica proporcional ao aumento da concentração de efluente (Figura 10a e 10b). Observou-se no extrato de hexano indução de atividade estrogênica em toda a série de diluição (Figura 10c), o que indica uma maior presença de compostos interagentes com o receptor de estrogênio da levedura eluídos pelo hexano.

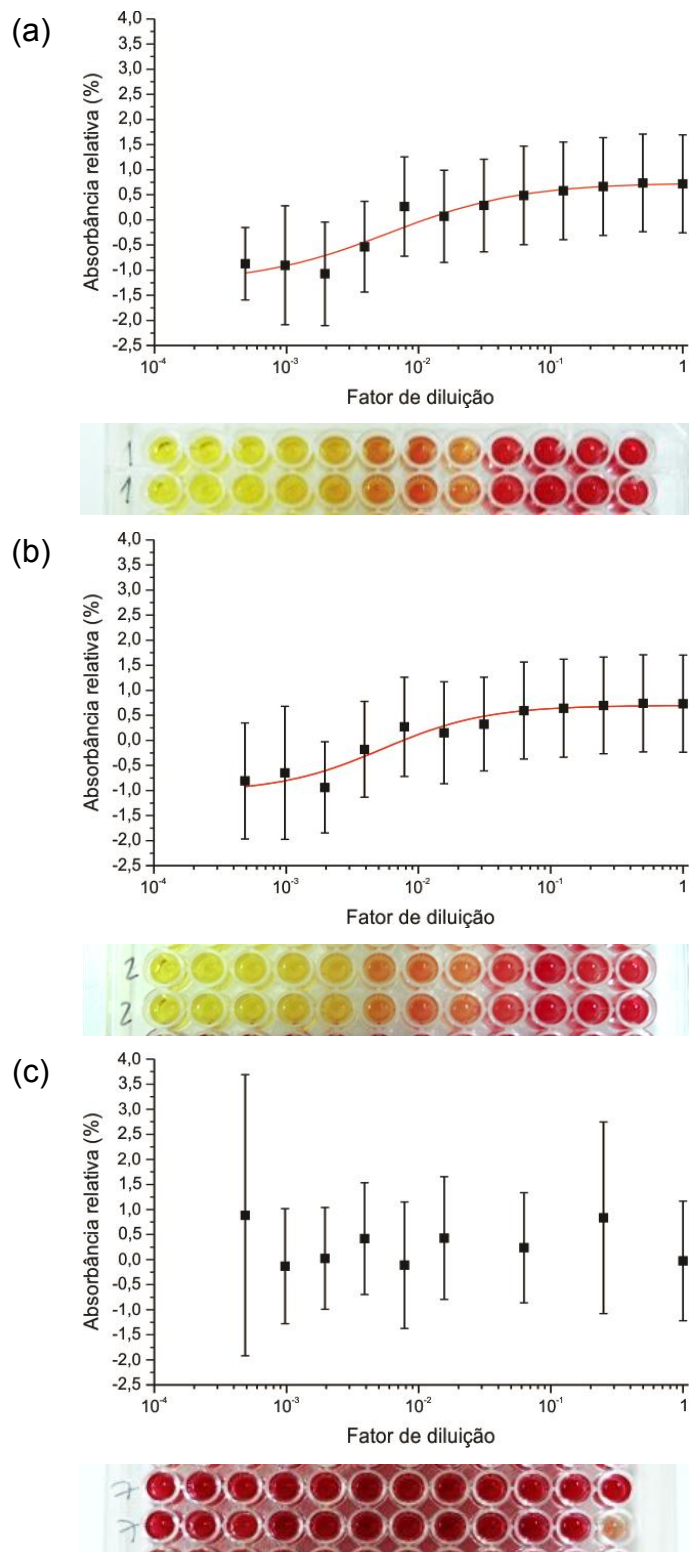


Figura 10 – Curvas e imagens da amostra do efluente não tratado submetido ao ensaio YES: extratos de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.

5.2 REMOÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA PELO TRATAMENTO COM REATOR MBBR

Para os extratos de efluente tratado nas COVs 0,4 e 1,2 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, não se observou a mudança de coloração do meio em nenhum dos três extratos, permanecendo a cor amarela em todos os poços. Assim, não se observou, nessas amostras, atividade estrogênica acima do limite de detecção do ensaio (26,61 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ do padrão EE2). De fato, em sistemas MBBR tratando efluente de celulose kraft de pinus, quando operados a COVs entre 0,25 e 1,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e com tempos de detenção hidráulica entre 0,5 e 2 d, já se observou níveis de remoção de atividade estrogênica em percentuais próximos a 80% (CHAMORRO *et al.*, 2010a).

Para os extratos de efluente tratado na COV 4,0 $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, pôde-se observar um perfil de crescimento na indução de atividade estrogênica com o incremento da concentração somente nas frações de acetato de etila e hexano (Figura 11b e 11c). Na fração de acetato de etila, houve mudança de coloração em todos os poços; além disso, tendo em vista os altos valores de absorbância obtidos para as maiores concentrações, pode-se atribuir a esse solvente uma maior especificidade em eluir compostos indutores de atividade estrogênica nessa amostra.

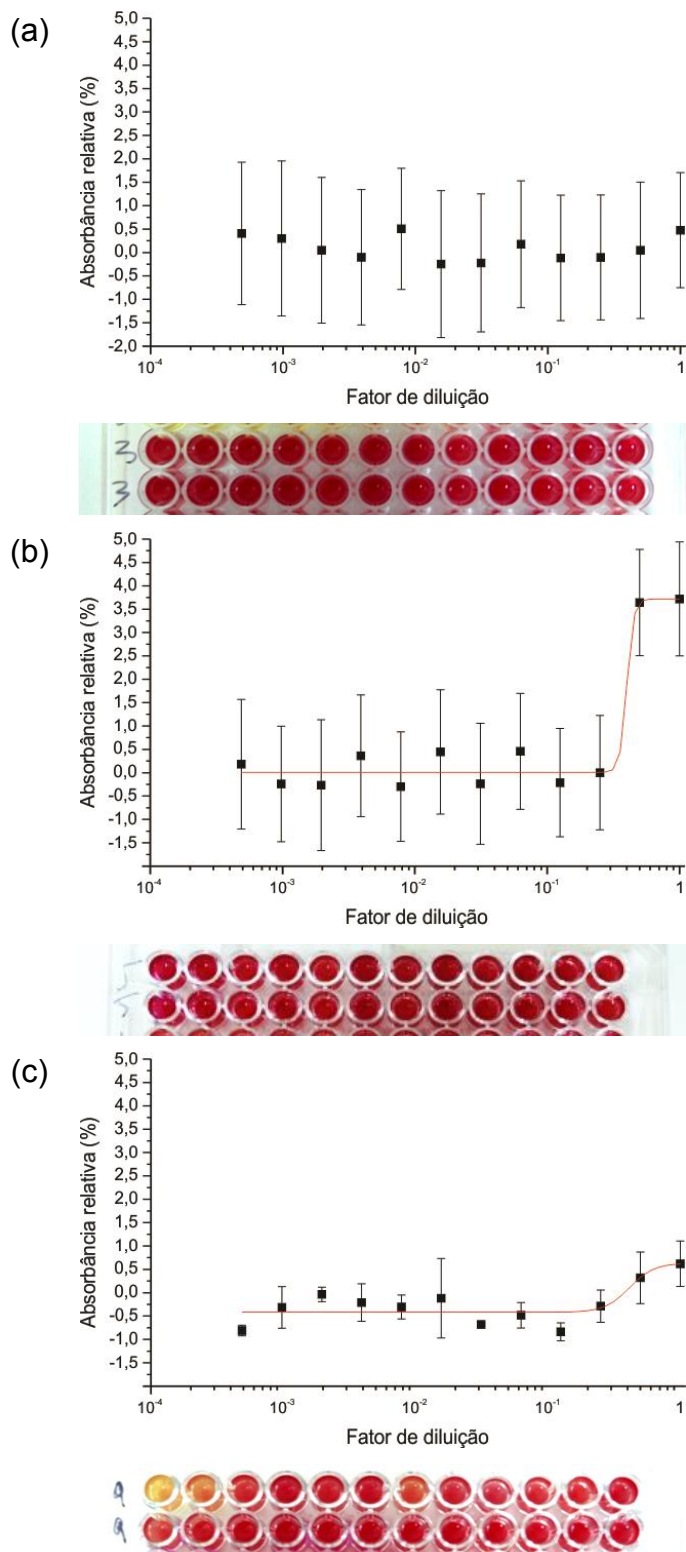


Figura 11 – Curvas e imagens do efluente tratado por MBBR na COV 4,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹ submetido ao ensaio YES: extratos de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.

Para os extratos de efluente tratado na COV 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹, apesar das oscilações de valores, pôde-se observar um perfil crescente na indução de atividade

estrogênica com a concentração para a fração de metanol (Figura 11a). Nas outras frações (Figura 12b e 12c) não se observou tal ocorrência.

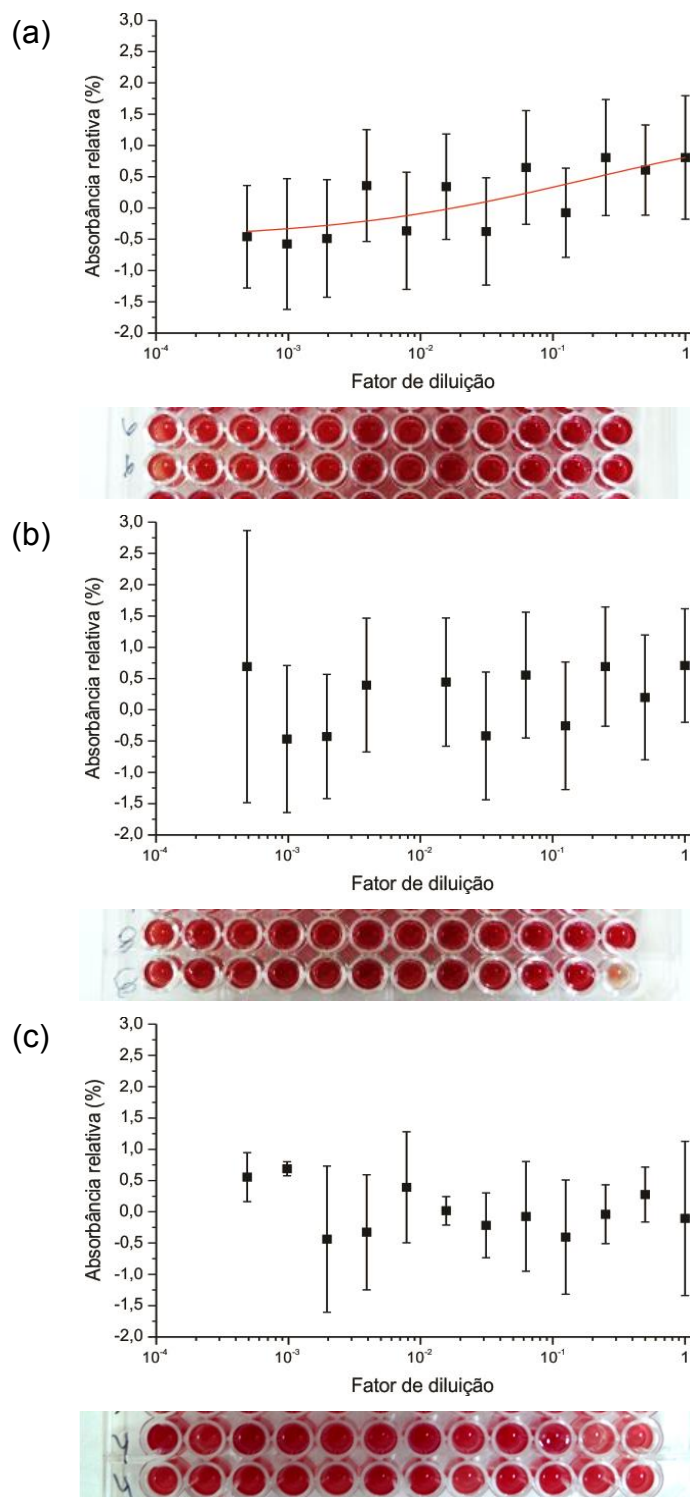


Figura 12 – Curvas e imagens da amostra de saída do reator MBBR operado à COV 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹ submetida ao ensaio YES: extratos de (a) metanol, (b) acetato de etila e (c) hexano.

A variabilidade não sistemática dos valores de absorvância conforme o aumento do fator de diluição pode estar associada à complexidade da matriz do efluente submetido ao ensaio, uma vez que a técnica possui alta sensibilidade analítica para detectar substâncias com baixo potencial estrogênico (BOVEE *et al.*, 2006). Além disso, deve-se considerar que, ao serem submetidos ao ensaio YES, os compostos presentes nos extratos e eluídos da matriz estavam 20x mais concentrados, por conta do processo de extração em fase sólida. Dentre as possibilidades, pode-se considerar a ocorrência de efeitos aditivos e sinérgicos entre os diversos compostos presentes no meio e capazes de interagir com o receptor de estrogênio (PAYNE *et al.*, 2000).

Além disso, as altas COVs e seus baixos tempos de retenção hidráulica associados podem induzir o fracionamento de macromoléculas (XAVIER *et al.*, 2009), cujos produtos de degradação seriam capazes de interagir com o receptor de estrogênio da levedura, além dos compostos de interesse (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

5.2.1 Comparação de efeitos com o padrão EE2

Apresenta-se na Figura 13 a curva dose-resposta obtida para o padrão EE2, cuja regressão logística ($R^2 = 0,99984$) indicou um valor de máxima indução da atividade estrogênica de 3,36% em absorvância relativa e uma EC_{50} de $0,626 \pm 0,053 \mu\text{g.L}^{-1}$.

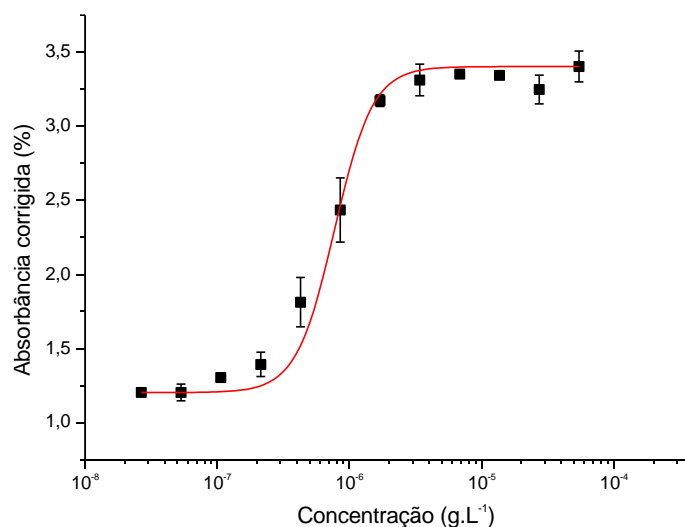


Figura 13 – Curva dose-resposta para o padrão EE2.

Apresenta-se na Tabela 5 os valores estimados¹ da concentração equivalente de padrão EE2 para causar o mesmo efeito estrogênico (EQ-EE2) observado para as amostras, obtidos da Equação 3, para aquelas que apresentaram perfil de incremento de atividade estrogênica com a concentração.

Tabela 5 – Valores de EQ-EE2 para as amostras do reator MBBR.

| Fração | EQ-EE2 do afluente (mg.L ⁻¹) | EQ-EE2 do efluente (mg.L ⁻¹) | |
|------------------|--|--|--|
| | | 4,0 g _{DQO} .L ⁻¹ .d ⁻¹ | 9,0 g _{DQO} .L ⁻¹ .d ⁻¹ |
| Metanol | 1,05 ± 1,14 | n.d. | 0,35 ± 0,38 |
| Acetato de etila | 11,7 ± 12,6 | 0,16 ± 0,17 | n.d. |
| Hexano | n.d. | 0,15 ± 0,16 | n.d. |

n.d. – não determinado

Observa-se um efeito de atividade estrogênica menor para as amostras de efluente em relação ao padrão, uma vez que seria necessária uma concentração de padrão maior que o de sua EC₅₀ para se manifestar o mesmo efeito observado para as amostras.

Ao se comparar os valores de EQ-EE2 do afluente e do efluente do reator para os extratos de metanol e acetato de etila, observa-se a princípio que os valores da entrada são numericamente maiores que os da saída. Porém, nesses dois casos, não se observa diferença estatística entre as médias obtidas (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise estatística dos dados estimados de EQ-EE2^a.

| Fração | Valor-p | Resultado |
|------------------|---------|-----------------|
| Metanol | 0,540 | $\mu_1 = \mu_2$ |
| Acetato de etila | 0,325 | $\mu_1 = \mu_2$ |
| Hexano | - | - |

^a Teste t de Student para amostras independentes, $\alpha = 0,05$.

¹ Os valores são somente estimados por conta do baixo ajuste de alguns dados ao modelo logístico.

5.3 ORIGEM DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA NO EFLUENTE

5.3.1 Resultado das análises cromatográficas

Apresenta-se na Tabela 7 um resumo das observações referentes a análise cromatográfica das amostras de efluente do reator MBBR, quanto à presença de picos de interesse, que apresentassem relação sinal/ruído maior que 100.

Tabela 7 – Resumo das observações dos cromatogramas obtidos para as amostras do reator MBBR.

| Fração | Afluente | Efluente | | | |
|------------------|----------|---|-----|-----|-----|
| | | COV (g _{DQO} ·L ⁻¹ ·d ⁻¹) | | | |
| | | 0,4 | 1,2 | 4,0 | 9,0 |
| Metanol | – | – | – | – | – |
| Acetato de etila | + | – | – | – | – |
| Hexano | + | – | – | – | – |

(+) Presença de picos de interesse; (–) ausência de picos de interesse.

Nos extratos referentes ao afluente, se observou a presença de picos somente nas frações de acetato de etila e hexano. A ausência deles na fração de metanol pode ser justificada pelo caráter apolar de seus componentes (ROWELL *et al.*, 2012). Por outro lado, para as amostras do efluente tratado por MBBR, não se observaram compostos de interesse em nenhum dos extratos analisados.

Apresenta-se nas Figuras 14 e 15 os cromatogramas que apresentaram picos de interesse, e na Tabela 8 os compostos identificados por espectrometria de massa.

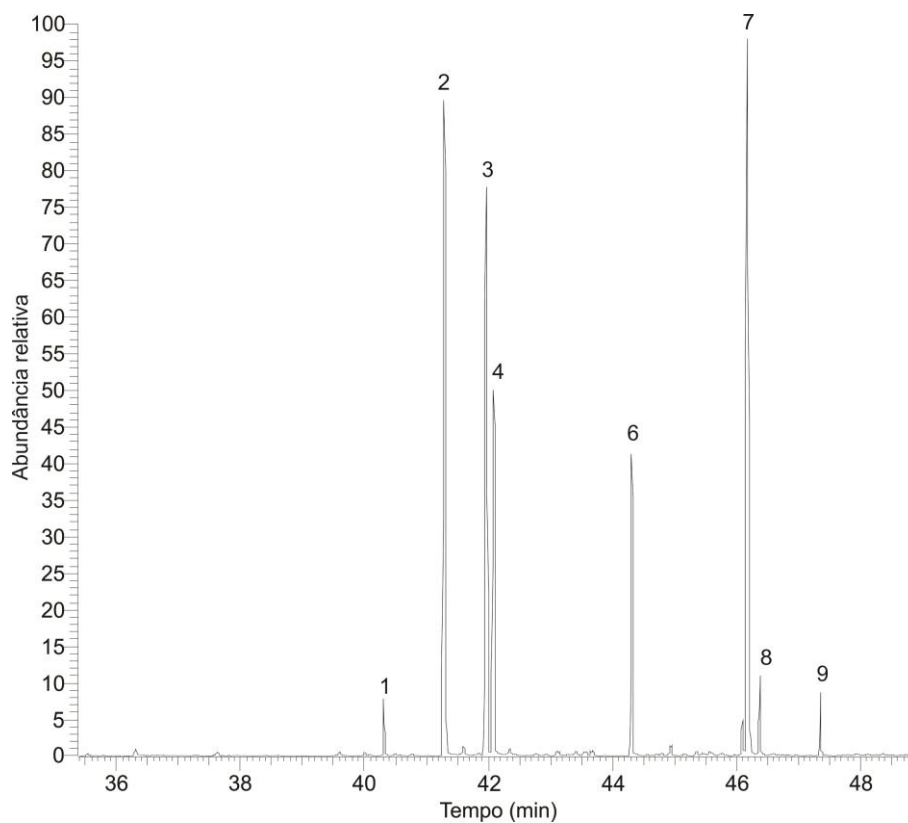


Figura 14 – Cromatograma obtido para o extrato de acetato de etila do afluente do reator MBBR.

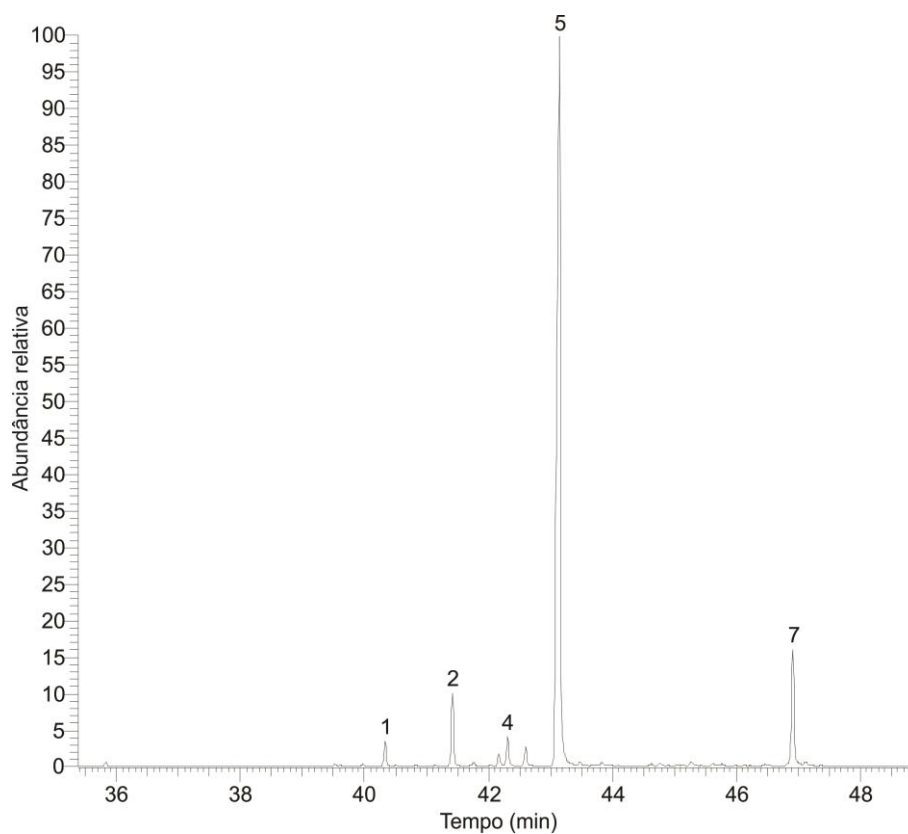


Figura 15 - Cromatograma obtido para o extrato de hexano do afluente do reator MBBR.

Tabela 8 – Compostos identificados nos extratos do afluente do reator MBBR.

| Número | Composto | Cromatogramas |
|--------|--------------------------|---------------|
| 1 | Ácido resínico* | Fig. 14 e 15 |
| 2 | Ácido pimárico | Fig. 14 e 15 |
| 3 | Ácido isopimárico | Fig. 14 |
| 4 | Ácido deidroabiético | Fig. 14 e 15 |
| 5 | Ácido abiético | Fig. 15 |
| 6 | Ácido oxideidroabiético | Fig. 14 |
| 7 | Estanol* | Fig. 14 e 15 |
| 8 | Triterpenoide cetônico* | Fig. 14 |
| 9 | Triterpenoide alcoólico* | Fig. 14 |

* Não se pôde atribuir um composto específico a esses picos.

Dentre os compostos evidenciados pela cromatografia e identificados através de seus espectros de massa, destaca-se a presença de compostos diterpenoides, grupo no qual se enquadram os ácidos resínicos. Observou-se a presença de ácido abiético no extrato de hexano e de ácido deidroabiético nos extratos de acetato de etila e de hexano.

Seus espectros de massa, tanto aqueles obtidos pela análise dos picos e os de referência do banco de dados do NIST (2013) são apresentados nas Figuras 16 e 17. Para o espectro do ácido abiético derivatizado, o grau de similaridade indicado pelo software Xcalibur é de 60%, porém os maiores picos obtidos estão de acordo com o reportado pela literatura (LATORRE *et al.*, 2003).

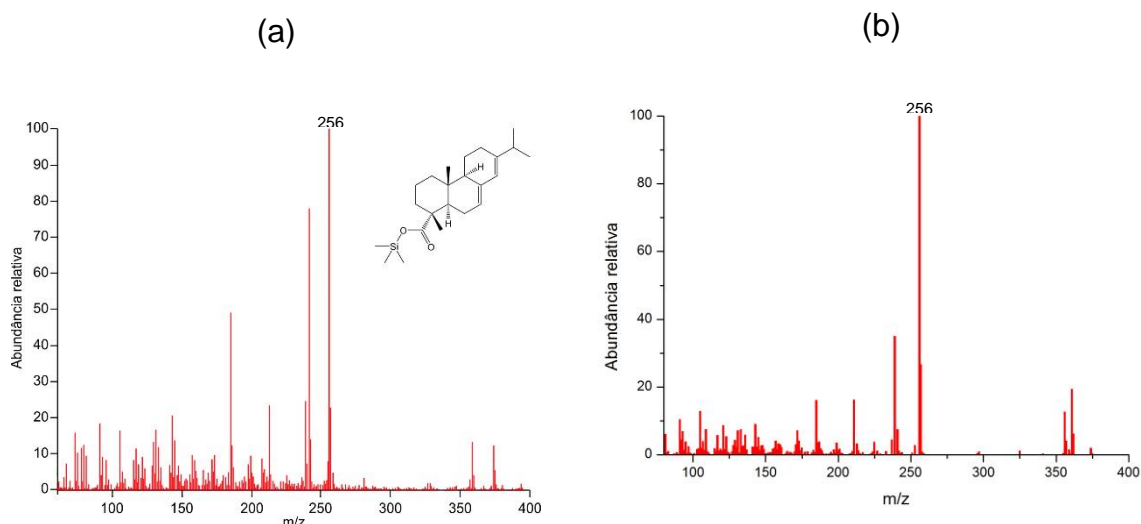


Figura 16 – Espectros de massa para o ácido abiético derivativado: experimental (a) e do banco de dados do NIST (b).

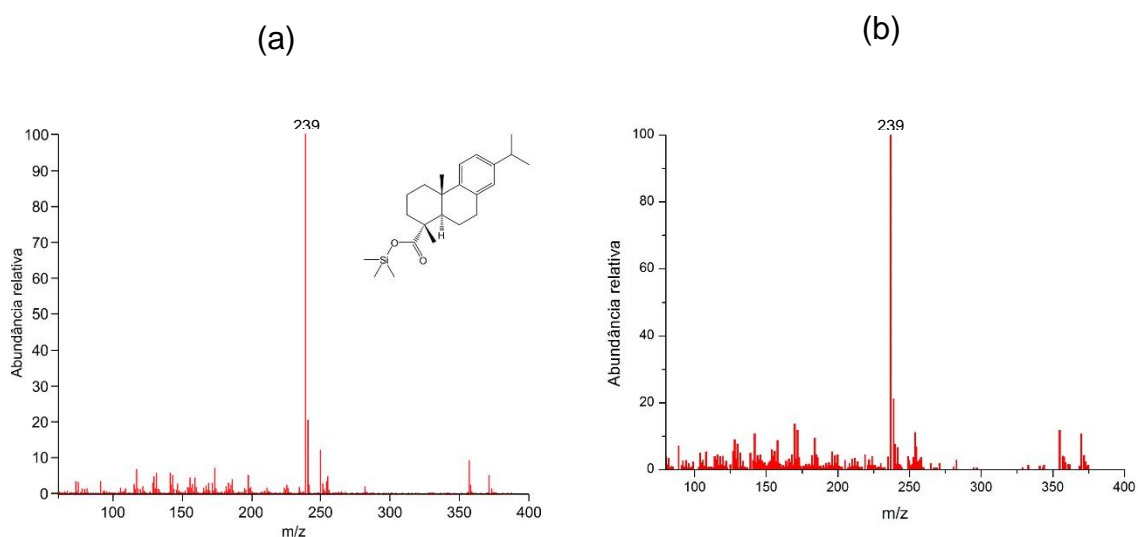


Figura 17 – Espectros de massa para o ácido deidroabiético derivativado: experimental (a) e do banco de dados do NIST (b).

Além desses, se observou a presença de alguns picos para compostos triterpenoides, alcoólicos e cetônicos, porém a nenhum destes pôde-se atribuir a ocorrência dos fitoesteróis de interesse, uma vez que não se tinha disponível, no momento das análises, compostos padrão para se fazer a comparação dos picos. De fato, a maior possibilidade de detecção de ácidos resínicos em detrimento a fitoesteróis pode ser justificada pela natureza da madeira de pinus, que é mais rica em ácidos resínicos do que em fitoesteróis (CHAMORRO, 2010).

5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

No efluente não tratado, se observou indução de atividade estrogênica em todos os extratos, o que indica a presença de compostos desreguladores endócrinos antes do tratamento biológico. Pelas análises cromatográficas, os compostos possivelmente responsáveis por esse efeito podem ser os ácidos resínicos, como o abiético e o deidroabiético, uma vez que não se identificaram fitoesteróis nos extratos.

Para as amostras do efluente tratado por MBBR, não se observaram compostos de interesse em nenhum dos extratos analisados. Tal constatação justifica a não indução de atividade estrogênica no efluente tratado nas COVs mais baixas. Porém, no caso das COVs mais altas, a resposta positiva das amostras nos ensaios de atividade estrogênica leva a considerar as seguintes possibilidades sobre os resultados:

- a) Os compostos de interesse estavam abaixo do limite de detecção da técnica cromatográfica, mesmo após o processo de concentração promovido pela extração em fase sólida. Nesse caso, sugere-se a otimização do método (tanto do preparo de amostra quanto das condições cromatográficas) para aumentar sua concentração e detecção nos extratos;
- b) Os compostos de interesse poderiam não estar de fato presentes nas amostras de efluente analisadas. Assim, sugere-se em estudos posteriores analisar a atividade estrogênica e os compostos presentes também na biomassa do sistema de tratamento, especialmente para COVs mais altas, para observar se realmente há a biodegradação desses ou se os mesmos se adsorveram à biomassa (MAHMOOD-KHAN e HALL, 2003; XAVIER *et al.*, 2009); bem como investigar quais são outros compostos passíveis de se encontrar no efluente da indústria de celulose kraft e que também poderiam induzir atividade estrogênica. Pode-se citar, nesse caso, a classe de compostos flavonoides (MIKSICEK, 1995).
- c) Para os casos em que houve indução de atividade estrogênica em todos os poços para as amostras, se sugere um aumento dos níveis de diluição para se verificar a faixa de concentração adequada para se obter uma curva logística abrangendo a região de mudança de coloração do amarelo para o vermelho. Assim, se observa uma necessidade de diluição das amostras para o ensaio YES, enquanto para a análise cromatográfica tal amostra

deve ter sua concentração aumentada para favorecer a detecção dos compostos de interesse.

6 CONCLUSÕES

Se observou a ocorrência de atividade estrogênica no efluente não tratado a qual pôde ser mensurada nas frações de metanol e acetato de etila. O sistema MBBR estudado, de uma maneira geral, teve um melhor desempenho na remoção de atividade estrogênica quando operado a COVs mais baixas (0,4 e 1,2 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹), o que não se evidenciou nas COVs mais altas (4,0 e 9,0 g_{DQO}.L⁻¹.d⁻¹).

A análise dos valores estimados da quantidade de padrão etinilestradiol que poderia elucidar o mesmo efeito (EQ-EE2) não indica remoção de atividade estrogênica nas COVs mais altas. Além disso, tais valores indicaram um efeito de indução de atividade estrogênica menos intenso do que o padrão.

Nas análises cromatográficas, se detectou a presença dos ácidos abiético e deidroabiético em extratos do efluente à entrada do reator MBBR, porém nesses casos não se observou a presença de fitoesteróis; enquanto nos extratos à saída do reator, não se identificou nenhum dos compostos de interesse.

Para melhor esclarecer as observações preliminares desse trabalho em estudos posteriores, sugere-se a otimização da metodologia de preparo de amostras e de análise cromatográfica do efluente, bem como fazer a análise de atividade estrogênica (ensaio YES) e de cromatografia também em extratos da biomassa do sistema MBBR.

REFERÊNCIAS

BACHMANN, D. L. Benchmarking ambiental na indústria de celulose e papel. **O PAPEL**, v. 70, n. 6, p. 57-61, 2009.

BAJPAI, P. **Environmentally friendly production of pulp and paper**: Wiley, 2011.

BATTA, A. K.; XU, G.; HONDA, A.; MIYAZAKI, T.; SALEN, G. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. **Metabolism**, v. 55, n. 3, p. 292-299, 2006.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**: CRC Press, 2010.

BOVEE, T. F.; BOR, G.; HESKAMP, H. H.; HOOGENBOOM, R. L.; NIELEN, M. W. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 6, p. 556-568, 2006.

BRACELPA. **Relatório Florestal 2010-2011**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/>>. Acesso em: 27/07/2013.

BRACELPA. **Dados do setor**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/>>. Acesso em: 20/03/2013.

BRASIL. **Cadeia Produtiva de Madeira**: IICA:MAPA/SPA, 2007, v.6.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA**.

BRINKLEY, J.; JOHNSON, C. H.; SOUZA, R. Moving Bed Biofilm Reactor Technology - A Full Scale Installation for Treatment of Pharmaceutical Wastewater. In: **87th Annual Conference - North Carolina American Water Works Association and the North Carolina Water Environment Association**, 2007, Charlotte, Carolina do Norte, EUA.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 1-5, 2009.

CHAMORRO, S.; POZO, G.; JARPA, M.; HERNANDEZ, V.; BECERRA, J.; VIDAL, G. Monitoring endocrine activity in kraft mill effluent treated by aerobic moving bed bioreactor system. **Water Science & Technology**, v. 62, n. 1, p. 154-161, 2010a.

CHAMORRO, S.; HERNÁNDEZ, V.; MONSALVEZ, E.; BECERRA, J.; MONDACA, M.; PIÑA, B.; VIDAL, G. Detection of estrogenic activity from kraft mill effluents by the

yeast estrogen screen. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 84, n. 2, p. 165-169, 2010b.

CHAMORRO, S. **Evaluacion de la actividad estrogenica presente en efluentes de celulosa kraft, tratados mediante un sistema biologico, a traves de ensayos con *Saccharomyces cerevisiae* recombinante y *Daphnia magna***. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). Centro EULA, Universidad de Concepción, Chile, 2010.

CHRISTIANSON-HEISKA, I.; ISOMAA, B. The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for in vitro screening of (anti)estrogenic activity of wood extractives. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 589-597, 2008.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; HOSPIDO, A.; MOREIRA, M. T.; ROMERO, J.; FEIJOO, G. Environmental impact assessment of total chlorine free pulp from *Eucalyptus globulus* in Spain. **Journal of cleaner production**, v. 17, n. 11, p. 1010-1016, 2009.

HAMM, U.; SCHABEL, S.; OELLER, H. Comparison of the endocrine effects of treated wastewaters from different paper mills by use of an *in-vitro* test with modified yeast cells. **Water Science & Technology**, v. 55, n. 6, p. 213-221, 2007.

HELALEH, M. I.; TAKABAYASHI, Y.; FUJII, S.; KORENAGA, T. Gas chromatographic–mass spectrometric method for separation and detection of endocrine disruptors from environmental water samples. **Analytica chimica acta**, v. 428, n. 2, p. 227-234, 2001.

HEWITT, L. M.; KOVACS, T. G.; DUBÉ, M. G.; MACLATCHY, D. L.; MARTEL, P. H.; MCMMASTER, 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**, v. 27, n. 3, p. 682-697, 2008.

KESKITALO, J.; LEIVISKÄ, K. **Mechanistic modelling of pulp and paper mill wastewater treatment plants**. Control Engineering Laboratory: University of Oulu, 2010.

KOH, Y.; CHIU, T.; BOOBIS, A.; CARTMELL, E.; SCRIMSHAW, M.; LESTER, J. Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. **Environmental technology**, v. 29, n. 3, p. 245-267, 2008.

LATORRE, A.; RIGOL, A.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Comparison of gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of fatty and resin acids in paper mill process waters. **Journal of Chromatography A**, v. 991, n. 2, p. 205-215, 2003.

MAHMOOD-KHAN, Z.; HALL, E. R. Occurrence and removal of plant sterols in pulp and paper mill effluents. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 2, n. 1, p. 17-26, 2003.

MELLANEN, P.; PETÄNEN, T.; LEHTIMÄKI, J.; MÄKELÄ, S.; BYLUND, G.; HOLMBOM, B.; MANNILA, E.; OIKARI, A.; SANTTI, R. Wood-Derived Estrogens: Studies *in Vitro* with Breast Cancer Cell Lines and *in Vivo* in Trout. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 381-388, 1996.

MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. In: **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, 1995, Nova Iorque, EUA:Royal Society of Medicine, p. 44-50.

MILLA, S.; DEPIEREUX, S.; KESTEMONT, P. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 2, p. 305-319, 2011.

MINEGATTI, D. V. O. **Caracterização dos Parâmetros de Controle e Avaliação de Desempenho de um Reator Biológico com Leito Móvel (MBBR)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

NIST. **NIST Chemistry WebBook**. National Institute of Standards and Technology. Disponível em <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 15/09/2013.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos. **Química**, v. 88, n., p. 301-322, 2003.

ORREGO, R.; GUCHARDI, J.; KRAUSE, R.; HOLDWAY, D. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 160-167, 2010.

PARANÁ. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Resolução nº 81 de 19 de outubro de 2010. **Dispõe sobre critérios e padrões de ecotoxicidade para o controle de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Paraná**.

PAYNE, J.; RAJAPAKSE, N.; WILKINS, M.; KORTENKAMP, A. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 10, p. 983, 2000.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

PESSOA, G. D. P.; SANTOS, A. B. D.; SOUZA, N. C. D.; ALVES, J. A. C.; NASCIMENTO, R. F. D. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, n., p. 968-973, 2012.

PHYSPROP. **Physical/Chemical Property Database**: secondary title. Syracuse Research Corporation, 2000.

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**, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

ROWELL, R. M.; PETTERSEN, R.; TSHABALA, M. A. Cell Wall Chemistry. In: Rowell, R. M. (Ed.). **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**: CRC Press, 2012.

SUMATHI, S.; HUNG, Y.-T. Treatment of Pulp and Paper Mill Wastes. In: Wang, L. K., Hung, Y.-T., *et al* (Ed.). **Waste Treatment in the Process Industries**: Taylor & Francis, 2010.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. The occurrence, causes, and consequences of estrogens in the aquatic environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 249-251, 2013.

VANZETTO, S. C. **Estudos de viabilidade de tratamento de efluente de indústria de celulose kraft por reator biológico com leito móvel (MBBR)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2012.

VEOLIA. **AnoxKaldnes™ MBBR - Technical details**. Disponível em: <http://www.veoliawaterst.com/mbbr/en/technical_details.htm>. Acesso em: 18/07/2013.

VON SPERLING, M. **Basic principles of wastewater treatment**: IWA publishing, 2007, v.2.

WALKER, J. C. F. **Primary Wood Processing: Principles and Practice**: Springer, 2006.

XAVIER, C. R. **Influencia de la tecnología de tratamiento en la eliminación de fitoesteroides contenidos en efluentes de celulosa kraft y en la toxicidad de estos compuestos en organismos acuáticos**. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). Centro EULA, Universidad de Concepción, Chile, 2006.

XAVIER, C. R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; BECERRA, J.; HERNÁNDEZ, V.; VIDAL, G. Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents containing β -sitosterol and stigmasterol. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 44, n. 4, p. 327-335, 2009.