

NIRLANE CRISTIANE SILVA

**EFEITOS ASSOCIADOS A MICROPOLUENTES DE PREOCUPAÇÃO
EMERGENTE EM CORPO HÍDRICO DE UM MUNICÍPIO DE MÉDIO
PORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586e
2018
Silva, Nirlane Cristiane, 1989-
Efeitos associados a micropoluentes de preocupação
emergente em corpo hídrico de um município de médio porte /
Nirlane Cristiane Silva. – Viçosa, MG, 2018.
xvii, 101 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Ann Honor Munteer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 77-89.

1. Água. 2. Sedimentos (Geologia). 3. Poluentes.
4. Antibióticos. 5. Toxicologia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Civil. II. Título.

CDD 22. ed. 628.161

NIRLANE CRISTIANE SILVA

**EFEITOS ASSOCIADOS A MICROPOLUENTES DE PREOCUPAÇÃO
EMERGENTE EM CORPO HÍDRICO DE UM MUNICÍPIO DE MÉDIO
PORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

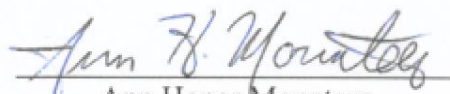
APROVADA: 13 de julho de 2018.



Cynthia Canêdo da Silva



Déborah Neide de Magalhães
(Coorientadora)



Ann Honor Munteer
(Orientadora)

Aos meus pais com muito amor e carinho, dedico.

*“Seria mais fácil fazer como todo mundo faz
O caminho mais curto, produto que rende mais
Seria mais fácil fazer como todo mundo faz
Um tiro certo, modelo que vende mais...
...Mas nós vibramos em outra frequência
Sabemos que não é bem assim
Se fosse fácil achar o caminho das pedras
Tantas pedras no caminho não seria ruim”*

(Engenheiros do Hawaii)

AGRADECIMENTOS

Por mais essa etapa que se encerra agradeço

A Deus por ter me dado força, atendido meus pedidos, e iluminado toda essa minha trajetória.

Aos meus pais e meu irmão por todo incentivo, amor e apoio. Essa vitória é nossa!

À minha orientadora Ann por todos os ensinamentos, pela excelente orientação, disponibilidade e atenção durante esses dois anos de convivência.

Aos meus familiares pela torcida.

Ao Lucius pela paciência, companheirismo, cumplicidade e carinho durante todos esses anos juntos. Te amo!

À Déborah pela amizade desde meus tempos de iniciação científica, atenção, disponibilidade e excelentes contribuições como coorientadora.

À professora Cynthia pela atenção, disponibilidade e valiosas contribuições para a melhoria desse trabalho.

Às irmãs AQUATOX (Elisa, Natália, Gemima “minha estagiária brava” e Priscila pela amizade, troca de conhecimentos, ajuda com os testes, caronas e melhores *happy hours*). Em especial à Andreiva por ter se tornado uma grande amiga, companheira de mestrado e por todas as horas (dias e noites) divididas no laboratório.

Aos estagiários Nicolás e Vinícius pela ajuda com as análises.

Aos queridos funcionários do LESA (Carlos, Capelão “faz a melhor pipoca do mundo” e Júlio pela convivência e por tornar nosso ambiente de trabalho mais descontraído). Em especial ao Agostinho pela incansável ajuda com as coletas e boa prosa e ao Marcelo pela amizade e por cuidar tão bem das nossas “filhotinhas” Cerio e Daphnia.

À Lívia pela prestatividade, ajuda com a extração de DNA e análise metagenômica.

À Ananda pela ajuda com a análise cromatográfica.

À Helen pela ajuda com as análises de metais.

Ao João Pimenta e ao Janderson do laboratório LCQA pelo empréstimo do oxímetro utilizado nas coletas.

Ao Eduardo pelo empréstimo da draga Petersen.

Ao Tomás pela paciência e ajuda com os dados.

À Cilene e ao Thiago por solucionar todos os nossos problemas com a Pós-graduação.

Às 14 (Bibs, Junis e Julis) pela amizade de sempre, torcida, melhores pautas e boas risadas. Amo vocês!

Às Capadocianas pela convivência e por tornar nossa rep o melhor lugar de se viver.

Às Colombinas pela hospedagem em Ouro Preto durante as análises cromatográficas.

Ao Thiago pela amizade e por me fazer rir das piores piadas.

Ao Vítor Baía pela amizade e bons conselhos.

Às amigas que construí ao longo dessa caminhada e que levarei para a vida toda.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E à todos que de alguma forma cruzaram meu caminho e contribuíram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE.....	3
3. OBJETIVOS	3
3.1. Objetivo geral	3
3.2. Objetivos específicos.....	3
4. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA	4
4.1. Avaliação da qualidade da água por meio de índices numéricos	4
4.2. Contaminantes de preocupação emergente	5
4.3. Desreguladores endócrinos.....	7
4.4. Antibióticos e resistência microbiana.....	12
4.5. Ensaio ecotoxicológicos	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1. Área de estudo	21
5.2. Coleta e preservação das amostras	22
5.3. Avaliação da qualidade da água por meio de índices numéricos	25
5.3.1. Índice de qualidade da água – IQA	25
5.3.2. Índice de qualidade da água para a proteção da vida aquática – IVA.....	28
5.4. Atividade estrogênica	31
5.4.1. Limpeza das vidrarias	31
5.4.2. Preparo das amostras.....	31
5.4.3. Extração em fase sólida.....	32
5.4.4. Ensaio <i>in vitro</i> YES.....	32
5.4.5. Avaliação da eficiência do método de EFS.....	34
5.5. Cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas (CG-EM).....	34
5.5.1. Preparo das amostras.....	35
5.6. Genes de resistência a antibióticos	36
5.6.1. Processamento das amostras	36

5.6.1.1.	Água	37
5.6.1.2.	Sedimento	37
5.6.2.	Extração do DNA	38
5.6.3.	Sequenciamento	39
5.6.4.	Análise das sequências	39
5.7.	Ensaio ecotoxicológicos	40
5.7.1.	Toxicidade crônica – <i>Ceriodaphnia dubia</i>	40
5.7.2.	Toxicidade crônica - <i>Raphidocelis subcapitata</i>	41
5.7.3.	Análise estatística.....	41
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1.	Avaliação da qualidade da água por meio de índices numéricos	43
6.1.1.	Índice de qualidade da água - IQA.....	43
6.1.2.	Índice de qualidade da água para a proteção da vida aquática - IVA	48
6.2.	Atividade estrogênica	53
6.2.1.	Ensaio <i>in vitro</i> YES.....	53
6.2.2.	Eficiência do método de EFS.....	58
6.3.	Genes de resistência a antibióticos	61
6.3.1.	Abundância de genes de resistência a antibióticos	63
6.3.2.	Mecanismos de resistência a antibióticos presente nas amostras ambientais	65
6.3.3.	Análise taxonômica dos genes de resistência a antibióticos	69
6.4.	Ensaio ecotoxicológicos	73
7.	CONCLUSÃO	75
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	APÊNDICE.....	90
	Apêndice A.....	91
	Tabela A1 – Valores de fósforo total e clorofila <i>a</i> utilizados no cálculo do IET para as amostras de água.....	91
	Tabela A2 – Valores dos parâmetros utilizados no cálculo do IPMCA nas amostras de água a montante e a jusante do município de Viçosa	92
	Apêndice B	93
	Tabela B1 – Compostos identificados pelo modo SCAN presentes nas amostras de sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa	93
	Apêndice C	97
	Tabela C1 – Características gerais das sequências de DNA das amostras analisadas	97

Apêndice D.....	98
Figura D1 – Perfil funcional das sequências metagenômicas das amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa.	98
ANEXOS	99
Anexo A	100
Tabela A1 – Variável que compõem do IPMCA e suas respectivas ponderações e níveis de qualidade.....	100
Anexo B.....	101

LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

BPA - Bisfenol - A	IPMCA - Índice de Variáveis Mínimas para a Proteção da Vida Aquática
BSTFA: 1% TCMS - bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1 % de trimetilclorosilano	IQA - Índice de Qualidade das Águas
CE ₅₀ - Concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão	IVA - Índice de Proteção da Vida Aquática
CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo	MG - RAST - <i>Meta Genome Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	m/z - Relação massa/carga
CPE - Contaminantes de preocupação emergente	N ₂ - Nitrogênio gasoso
CPRG - Clorofenol Vermelho- β -D-Galactopiranosídeo	NP - Nonilfenol
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio	NSF - <i>National Sanitation Foundation</i>
DES - Dietilestilbestrol	NT - Não Tóxico
E1 - Estrona	OD - Oxigênio Dissolvido
E2 - 17 β -Estradiol	OP - Octilfenol
EE2 - 17 α -Etinilestradiol	PCB - Bifenilas Policloradas
E3 - Estriol	PI - Padrão Interno
EA - Efeito Agudo	REh - Receptor de Estrogênio Humano
EFS - Extração em Fase Sólida	SCAN - <i>scanning ion</i>
ERE - Elementos de Respostas a Estrogênios	SDS - dodecil sulfato de sódio
GRA - Genes de resistência a antibióticos	SNIS - Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento
IET - Índice de Estado Trófico	ST - Substâncias Tóxicas
IGAM - Instituto Mineiro de Gestão das Águas	VE - Variáveis Essenciais
	T - Tóxico
	YES - <i>Yeast Estrogen Screen</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da expressão do estrogênio na levedura <i>S. cerevisiae</i> . (1) o gene do receptor humano (REh) é integrado no genoma principal e é expresso; (2) acoplado aos elementos de respostas a estrogênios (ERE) no promotor híbrido do plasmídeo de expressão; (3) o receptor é ativado; (4) o estrogênio se liga ao receptor e o gene receptor Lac-Z é expresso; (5) a enzima β -galactosidase produzida é excretada no meio; (6) o substrato cromogênico CPRG (amarelo) é metabolizado pela β -galactosidase em um produto de coloração rosa.....	11
Figura 2 - Microbacia hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu e localização dos pontos de coleta de amostras a montante (Palmital) e a jusante (Barrinha) do núcleo urbano de Viçosa.....	22
Figura 3 - Ribeirão São Bartolomeu a montante (a) e Rio Turvo Sujo a jusante (b) do município de Viçosa.....	23
Figura 4 - Vazão do Ribeirão São Bartolomeu de janeiro a agosto de 2017 (SAAE, Viçosa).	24
Figura 5 - Plano experimental do desenvolvimento da pesquisa.	24
Figura 6 - Esquema da microplaca de 96 poços com distribuição das replicatas da curva de 17 β -estradiol e amostras intercaladas com o branco.	33
Figura 7 - IQA do Ribeirão São Bartolomeu a montante e Rio Turvo Sujo a jusante do centro urbano de Viçosa, durante o período de monitoramento.	46
Figura 8 - IET obtidos do ponto a montante e a jusante durante o período de monitoramento.	48
Figura 9 - IVA obtido dos pontos a montante e a jusante durante o período de monitoramento.	51

Figura 10 - Curva dose-resposta padrão com a média das absorbâncias corrigidas em função da concentração log para o controle-positivo 17 β -estradiol.	53
Figura 11 - Concentração da atividade estrogênica em equivalentes de 17 β -estradiol (EQ-E2) em ng/L nas amostras de água a montante e a jusante do município de Viçosa-MG.	54
Figura 12 - Placa de ensaio do YES com inibição no crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> (ausência de turvação nos poços) após incubação.	56
Figura 13 - Abundância relativa dos filos de bactéria presente nas amostras de água e sedimento dos pontos a montante e a jusante do município de Viçosa.	62
Figura 14 - Número de sequências de genes de resistência a antibióticos nas amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa coletadas nos meses de abril e julho de 2017.....	64
Figura 15 - Percentagem dos genes de mecanismos de resistência a antibióticos encontrados nas amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa.....	66
Figura 16 - Heat map com abundância de bactérias que contém genes de resistência a antibióticos presente nas amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa. A cor cinza indica que não foi detectada bactéria com genes de resistência a antibiótico nas amostras. A = Abril e J = Julho. Destacado em vermelho: bactérias contendo genes de resistência a mais de um tipo de antibiótico.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desreguladores endócrinos e suas faixas de concentrações encontrados em águas superficiais no Brasil.....	9
Tabela 2 - Classificação dos principais antibióticos com base no mecanismo de ação exercido contra bactérias patogênicas	13
Tabela 3 - Mecanismos de resistência bacteriana, principais antibióticos e microrganismos afetados.....	14
Tabela 4 - Parâmetros físicos, químicos e microbiológico e respectivos métodos e equipamentos utilizados na determinação do IQA.....	26
Tabela 5 - Pesos atribuídos aos parâmetros de avaliação da qualidade da água para o cálculo do IQA	26
Tabela 6 - Classificação dos valores de IQA	27
Tabela 7 - Parâmetros e métodos utilizados na determinação do IPMCA.....	28
Tabela 8 - Classificação do IPMCA em níveis de qualidade da água	29
Tabela 9 - Classificação do IET para rios e ponderação do nível de trofia para fins de cálculo do IVA	30
Tabela 10 - Classificação dos valores de IVA em níveis de qualidade da água	31
Tabela 11 - Relação m/z para a quantificação e para a identificação dos desreguladores endócrinos monitorados por CG-EM.....	36
Tabela 12 - Número de acesso da biblioteca disponível no MG-RAST	40

Tabela 13 - Valores dos parâmetros físicos, químicos e microbiológico avaliados nas amostras de água do Ribeirão São Bartolomeu a montante e Rio Turvo a jusante da área urbana de Viçosa, utilizados no cálculo do IQA.....	44
Tabela 14 - Variáveis essenciais e substância tóxica que compõem o IPMCA.....	50
Tabela 15 – Porcentagem de inibição do crescimento da levedura durante o ensaio YES nas amostras de sedimento a montante e a jusante da área urbana do município de Viçosa.....	57
Tabela 16 - Identificação dos micropoluentes por CG-EM nas amostras que apresentaram resultado positivo para a estrogenicidade no ensaio YES	59
Tabela 17 - Antibióticos mais vendidos nas principais farmácias de Viçosa e suas respectivas classes durante o período de janeiro a agosto de 2017	69
Tabela 18 - Toxicidade crônica das amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa.....	73

RESUMO

SILVA, Nirlane Cristiane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Efeitos associados a micropoluentes de preocupação emergente em corpo hídrico de um município de médio porte.** Orientadora: Ann Honor Mounteer. Coorientadora: Déborah Neide de Magalhães.

A contaminação dos recursos hídricos decorrente de uma série de compostos contaminantes de preocupação emergente tornou-se um grande perigo para a saúde humana e animal nos últimos anos. Esses compostos são substâncias biologicamente ativas, dentro dos quais se destacam os desreguladores endócrinos e os antibióticos. Podem atingir diversas matrizes ambientais, principalmente como consequência do lançamento de esgoto, e desencadear efeitos adversos aos organismos expostos a concentrações traço. Como forma de identificar a presença e os efeitos proporcionados por esses contaminantes no ambiente, ensaios biológicos, análises químicas e tecnologias de biologia molecular têm se mostrado ferramentas promissoras na determinação desses compostos principalmente em corpos hídricos. Tendo em vista as crescentes preocupações proporcionadas pela poluição no comprometimento do ambiente e da biota aquática ressaltadas em inúmeros trabalhos científicos, esse estudo objetivou avaliar o impacto do lançamento de esgotos *in natura* associado a contaminantes de preocupação emergente em água e sedimento do corpo hídrico a montante e a jusante do centro urbano de um município de médio porte. Índices numéricos foram empregados para avaliar a qualidade da água para usos múltiplos (abastecimento e proteção da vida aquática) do corpo hídrico em amostras coletadas mensalmente de janeiro a agosto de 2017. A presença de atividade estrogênica foi avaliada utilizando o ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*) e a composição bacteriana e a presença de genes que conferem resistência a antibióticos foram acessadas por metagenômica nas amostras de água e sedimento. Os ensaios biológicos YES, foram complementados pela análise cromatográfica para identificar compostos estrogênicos. A toxicidade crônica das amostras foi avaliada em ensaios de curta duração com a microalga *Raphidocelis subcapitata* para a água e com o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* para o sedimento. Os resultados permitiram constatar a deterioração da qualidade da água após passar pela cidade e a péssima qualidade para a proteção da vida aquática, tanto antes quanto após o centro urbano. Estrogenicidade foi observada nas amostras coletadas a jusante do centro urbano em todos os meses de coleta, com concentração

máxima em equivalentes de 17- β -estradiol (EQ-E₂) de 31,5 ng/L, e a montante em apenas um mês de coleta, com concentração de EQ-E₂ igual a 0,28 ng/L. Foi possível identificar a presença dos micropoluentes 4-octilfenol, 4-nonilfenol, bisfenol-A e 17- β -estradiol nas amostras de água a jusante e 17- α -etinilestradiol a montante do centro urbano. Genes de resistência a antibióticos foram verificados em todas as amostras coletadas. Os ensaios ecotoxicológicos não correlacionaram com a presença de contaminantes de preocupação emergente verificados nas amostras de água e sedimento pelos ensaios biológicos, análise cromatográfica e de biologia molecular. A combinação de ensaios biológicos com análises cromatográfica e molecular mostrou que a poluição do corpo hídrico devido a presença de micropoluentes pode oferecer riscos ao ecossistema aquático e à saúde humana, bem como a falta de proteção adequada de um dos mananciais de abastecimento da cidade.

ABSTRACT

SILVA, Nirlane Cristiane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Effects associated of micropollutants of emerging concern in a water body from a mid-sized city.** Adviser: Ann Honor Munteer. Co-adviser: Déborah Neide de Magalhães.

Contaminants of emerging concern in surface waters have become a serious human and animal health hazard in recent years. Endocrine disruptors and antibiotics are among the most worrisome of these biologically active compounds. They can spread to various environmental compartments, mainly through sewage discharge to receiving waters, and unleash adverse effects in exposed organisms at trace levels. Biological assays, chemical analyses and molecular biology techniques have been shown to be promising tools for identification of the environmental effects caused by these compounds, especially in aquatic ecosystems. Given the growing concern regarding the presence of micropollutants in surface waters reported in innumerable recent studies, the objective of this study was to compare and evaluate effects associated with contaminants of emerging concern in a water body, upstream from a municipal water treatment station and downstream from the point of raw sewage discharge in a mid-sized Brazilian city. Numerical indices were employed to evaluate water quality for multiple uses (water supply and protection of aquatic wildlife) in samples collected monthly from January to August, 2017. Estrogenic activity was quantified by the yeast estrogen screen (YES) and the presence of antibiotic resistance genes (ARG) and bacteria (ARB) were detected through metagenomic analysis of water column and sediment samples. YES results were complemented by chromatography to identify estrogenic compounds. Chronic toxicity was evaluated in short-term tests using the green algae *Raphidocelis subcapitata* for water samples and the cladoceran *Ceriodaphnia dubia* for sediment samples. Results showed water quality was deteriorated after passage through the city and was improper for protection of aquatic wildlife both upstream and downstream of the urban area. Estrogenicity was detected in all water samples collected downstream, with a maximum concentration of 31.5 ng/L 17- β -estradiol equivalents (E2-Eq). Only one monthly sample collected upstream showed estrogenicity of 0.28 ng/L E2-Eq. Micropollutants detected downstream from the sewage discharge point included 4-octylphenol, 4-nonylphenol, bisphenol-A and 17- β -estradiol, while upstream only 17- α -ethinyl estradiol was found. ARGs were found in all water and sediment samples collected, both upstream and downstream of the urban center. Ecotoxicological results

did not correlate with the presence of contaminants of emerging concern detected through YES, chromatography or molecular biology. The combination of biological assays with chromatographic and molecular analysis has shown that pollution of the water body due to the presence of micropollutants can pose risks to the aquatic ecosystem and human health as well as the lack of adequate protection of one of the city's two drinking water sources.

1. INTRODUÇÃO

A poluição dos recursos hídricos ao longo dos anos tornou-se uma das principais ameaças para o ecossistema aquático e para a população em geral. Dentre as várias fontes de contaminantes, destacam-se, atualmente, os contaminantes de preocupação emergente (CPE). Essas substâncias de origem antrópica ou natural compreendem as classes dos fármacos, pesticidas, surfactantes, produtos de cuidado pessoal e hormônios que entram no ambiente por meio de fontes pontuais e difusas. A presença desses compostos, já existentes no ambiente há anos, tem recebido grande atenção nos dias atuais devido à capacidade de serem biologicamente ativos mesmo em concentrações traço.

Alguns estudos que investigaram a presença e as possíveis implicações decorrentes da exposição aos CPE apontam as estações de tratamento de esgoto como a fonte mais relevante de contaminação dos cursos d' água, devido à baixa eficiência na eliminação dessas substâncias por processos convencionais de tratamento (CRISTALE et al., 2013; JIANG; ZHOU; SHARMA, 2013; ESTEBAN et al., 2014; JASINSKA et al., 2015; MAIER et al., 2015; KÖNIG et al., 2017; LAUNAY; DITTMER; STEINMETZ, 2016; ZHA et al., 2017). Essa situação se torna mais grave no Brasil, onde o saneamento básico é precário e as águas residuárias sem tratamento prévio são, frequentemente, descartadas no meio ambiente.

Dentre os CPE que oferecem elevado perigo ao ecossistema aquático e a saúde humana, destacam-se os desreguladores endócrinos, capazes de causar modificações no funcionamento do sistema endócrino, e os antibióticos, que podem selecionar no ambiente microrganismos resistentes. Entretanto, no Brasil ainda são incipientes os trabalhos que relatam a atividade estrogênica, resistência aos antimicrobianos e os efeitos tóxicos provocados por essas substâncias em ambientes como águas e sedimentos de corpos hídricos receptores de esgoto.

Diante dessa realidade, a qualidade das águas superficiais sofre graves alterações, uma vez que os micropoluentes não são monitorados rotineiramente e estudos ecotoxicológicos ainda são limitados no país. Dessa forma, pouco se sabe sobre a presença dos CPE em corpos hídricos no Brasil, o que contribui para o aumento de danos ecológicos com risco de toxicidade a curto e longo prazo e, eventualmente, de surgimento de doenças.

Métodos químicos analíticos têm sido bastante empregados para identificar e quantificar a presença de CPE em amostras ambientais. No entanto, esses métodos se mostram insuficientes na determinação dos efeitos biológicos provocados pela exposição a esses compostos. Quando aliado aos métodos analíticos, a utilização de bioensaios permite constatar a atividade biológica resultante da presença dos CPE. Assim, além dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos convencionalmente mensurados para avaliar e calcular índices de qualidade da água torna-se necessário o uso de bioensaios e tecnologias de biologia molecular para determinar a presença de estrogenicidade, resistência microbiana e efeitos tóxicos provocados por esses contaminantes em ambientes aquáticos.

O Ribeirão São Bartolomeu se encontra inteiramente no município de Viçosa-MG. Serve como manancial de captação para duas estações de tratamento de água e recebe o lançamento de esgotos não tratados ao longo do seu trajeto, provenientes de atividades pecuárias, do *campus* da Universidade Federal de Viçosa, de residências, comércios, hospitais e indústrias, além de outras fontes poluidoras. Após passar pela área urbana, deságua no Rio Turvo Sujo. Sabe-se que o lançamento de esgotos contribui para a deterioração da qualidade da água e é considerada a principal fonte de contaminação por CPE no ambiente aquático.

Apesar de ser alvo de intensa contaminação, o Ribeirão São Bartolomeu e o Rio Turvo Sujo ainda não foram estudados com relação à presença de CPE, o que serviu de motivação para o desenvolvimento dessa pesquisa. Assim, o presente trabalho foi realizado para comparar a qualidade da água superficial e dos sedimentos do Ribeirão São Bartolomeu e Rio Turvo Sujo, localizados a montante e a jusante, respectivamente, do centro urbano do município de Viçosa, no que tange a efeitos associados à presença de CPE: atividade estrogênica, resistência a antimicrobianos e toxicidade.

2. HIPÓTESE

Esgotos lançados *in natura* no corpo hídrico que passa pelo centro urbano do município de Viçosa – MG levam a efeitos associados à presença de contaminantes de preocupação emergente, como desregulação endócrina, alteração da diversidade e da abundância de genes de resistência a antibióticos e toxicidade crônica, que não são detectados em manancial localizado a montante da cidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar impactos do lançamento de esgotos *in natura* associados a contaminantes de preocupação emergente sobre a qualidade da água e sedimento no Ribeirão São Bartolomeu localizado a montante e Rio Turvo Sujo a jusante do centro urbano do município de Viçosa – MG.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar a qualidade da água do corpo hídrico, a montante e a jusante do centro urbano, sob o ponto de vista físico, químico e microbiológico por meio de índices numéricos.
- Avaliar a presença e identificar compostos desreguladores endócrinos no corpo hídrico e sedimento, a montante e a jusante do centro urbano.
- Identificar e comparar a presença de genes de resistência a antibióticos no corpo hídrico e no sedimento, a montante e a jusante do centro urbano.
- Avaliar a presença de toxicidade crônica no corpo hídrico e sedimento, a montante e a jusante do centro urbano.

4. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

4.1. Avaliação da qualidade da água por meio de índices numéricos

O comprometimento da qualidade das águas de rios e reservatórios, muitas vezes utilizados para o abastecimento público, se deve à diversidade e quantidade excessiva de poluentes lançados constantemente no meio ambiente e à falta de sistemas de coleta e tratamento dos esgotos gerados pela população.

Os valores da concentração de poluentes presentes nos corpos hídricos têm pouco significado para o público, uma vez que a interpretação dos dados requer um conhecimento técnico mais aprofundado (VON SPERLING, 2007). Com o intuito de facilitar a comunicação com o público, o Índice de Qualidade da Água (IQA) é bastante utilizado, uma vez que permite classificar a qualidade das águas utilizando apenas um único valor (VON SPERLING, 2007). Esse índice busca avaliar a qualidade das águas visando o abastecimento público e reflete os impactos decorrentes do lançamento de esgotos domésticos nos cursos d'água. Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) adotou o IQA no projeto Águas de Minas, responsável pelo monitoramento das águas superficiais de bacias hidrográficas em vários pontos no estado (IGAM, 2018).

O IQA compreende uma associação de nove parâmetros considerados os mais relevantes na avaliação da qualidade da água, os quais incluem *Escherichia coli*, pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrato, fósforo total, temperatura, turbidez, sólidos totais e oxigênio dissolvido (OD). Esses parâmetros foram estabelecidos pela *National Sanitation Foundation* (NSF) dos Estados Unidos, por meio de uma pesquisa que agregou a opinião de um grupo de especialistas da área para o desenvolvimento do índice.

Além do monitoramento da qualidade da água visando o abastecimento público, outro índice, conhecido como Índice de Proteção da Vida Aquática (IVA), é utilizado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), visando a proteção da fauna e flora aquáticas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). O IVA é composto pelo Índice de Variáveis Mínimas para a Proteção da Vida Aquática (IPMCA) e Índice de Estado Trófico (IET).

Esses índices são capazes de caracterizar a qualidade da água com base na presença de contaminantes químicos tóxicos, efeitos ecotoxicológicos, grau de trofia, ou seja, quanto à presença de nutrientes e crescimento de algas e macrófitas, além de

apontar a deficiência de parâmetros essenciais à biota aquática como pH e OD, sendo considerado um dos índices mais completos na avaliação de ambientes aquáticos (BUCCI; DELGADO; DE OLIVEIRA, 2015; DUARTE-DOS-SANTOS et al., 2016).

Embora o uso desses índices seja extremamente eficiente na avaliação da qualidade das águas devido a contaminação provocada pelo lançamento de esgotos, como mostra o estudo realizado por Medeiros et al. (2017), o IQA não foi estabelecido para constatar a presença de CPE nos cursos d'água, o que torna indispensável a aplicação de bioensaios e outras técnicas como métodos auxiliares na identificação desses compostos.

4.2. Contaminantes de preocupação emergente

Nas últimas décadas, o acelerado crescimento populacional e a urbanização vêm contribuindo para o aumento de danos à saúde pública e ao meio ambiente. Tal fato é consequência da situação precária do saneamento básico no Brasil, que ainda dispõe de poucos centros urbanos com coleta e tratamento de esgotos antes do lançamento no meio aquático. De acordo com dados publicados pelo Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), em 2016 apenas 44,9% da população brasileira foi atendida com o tratamento de esgoto (SNIS, 2016).

O lançamento de esgotos nos corpos hídricos tem ocasionado a presença de contaminantes emergentes, proporcionando uma série de consequências negativas à biota aquática e à saúde humana, tornando-se uma questão de preocupação mundial. Os contaminantes de preocupação emergente, também chamados micropoluentes, incluem substâncias de origem natural ou sintética, que vêm sendo introduzidas no ambiente há muito tempo, mas por serem encontrados tipicamente em baixas concentrações, tiveram seus efeitos indesejáveis reconhecidos apenas nas últimas décadas (MEFFE; DE BUSTAMANTE, 2014).

Os micropoluentes compreendem as classes dos fármacos, hormônios naturais e sintéticos, produtos químicos, industriais e de cuidado pessoal, como cosméticos, desodorantes, fragrâncias e filtro solar, entre outros (LUO et al., 2014). Esses compostos apresentam capacidade de bioacumulação nos tecidos de animais e no ambiente e podem ser detectados a baixas concentrações, variando de micro a nanogramas por litro (PENG et al., 2017).

Encontrados em diversas matrizes ambientais, os micropoluentes podem estar presentes em águas superficiais, subterrâneas, lixiviado de aterro sanitário, efluentes

industriais e hospitalares, dejetos de animais, esgotos domésticos, efluentes de estações de tratamento e água potável (LI, 2014; OMAR et al., 2016; PLAHUTA et al., 2017; SUN et al., 2016; ZHANG et al., 2017). As estações de tratamento de esgoto convencionais são insuficientes na eliminação de micropoluentes, uma vez que os processos biológicos utilizados foram concebidos para remover poluentes orgânicos biodegradáveis, nutrientes e organismos patogênicos (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

A liberação contínua de micropoluentes em corpos hídricos, também contribui para o aumento da concentração dessas substâncias no sedimento, ocasionando efeitos adversos aos organismos presentes na coluna d'água assim como os de hábitos bentônicos (PENG et al., 2017).

Bai et al. (2018) avaliaram a presença de fármacos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas e hormônios, além de outros contaminantes emergentes em uma bacia hidrográfica impactada pela atividade antrópica nos Estados Unidos. Os pesquisadores constataram a presença de todos os contaminantes avaliados nas amostras de água. No entanto, os fármacos apresentaram-se em maior concentração, com uma média variando de 10 a 25 ng/L. De acordo com os autores, o lançamento de águas residuárias pode ser considerado a principal fonte dos contaminantes na água. Além disso, a variação sazonal também pode ter influenciado na diferença de concentração entre os contaminantes detectados.

Sodré et al. (2010) verificaram a presença de micropoluentes na água para consumo de um milhão de pessoas na cidade de Campinas, São Paulo, e detectaram cafeína, bisfenol-A, colesterol e estigmasterol em todas as amostras coletadas, prevalecendo na estação seca a presença de hormônios naturais, como 17- β -estradiol e estrona. Nesse mesmo trabalho, constatou-se no corpo d'água, também usado para descarte de esgotos domésticos, a presença de todos os compostos citados anteriormente, porém em concentrações mais elevadas. Os resultados da pesquisa indicaram uma forte associação entre a contaminação por esgotos *in natura* e a presença de micropoluentes na água no ponto de captação para abastecer a população da cidade.

Embora seja constante a presença desses contaminantes no meio ambiente, a maioria ainda não é incluída em legislação vigente relacionada à qualidade da água e estudos relacionados à presença desses micropoluentes emergentes no Brasil ainda são pouco difundidos (MACHADO et al., 2016).

4.3. Desreguladores endócrinos

Dentre as classes de contaminantes de preocupação emergente, atualmente tem se destacado os desreguladores endócrinos, devido à sua capacidade de causar alterações no sistema endócrino. Os desreguladores endócrinos são compostos biologicamente ativos definidos como “agentes que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e, ou comportamento do organismo” (USEPA, 1997).

Esses compostos podem ser produzidos naturalmente, a exemplo dos fitoestrogênios em plantas, androgênios e estrogênios [estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e estriol (E3)] presentes em humanos e animais. Também podem ser de origem sintética como pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas (PCB), dioxinas, bisfenol-A (BPA), contido em plastificantes, substâncias farmacêuticas, a exemplo do 17- α -etinilestradiol (EE2) utilizado em contraceptivos, e octilfenol (OP) e nonilfenol (NP), presentes em surfactantes, entre outros (OMAR et al., 2016).

As substâncias estrogênicas presentes no ambiente são conhecidas como exoestrogênios ou estrogênios ambientais e podem intervir no sistema endócrino por diferentes mecanismos de ação, sendo que o mais estudado é pela via de receptores de hormônio (BILA; DEZOTTI, 2007). Esse mecanismo pode desempenhar uma ação agonista ou antagonista quando há interação do receptor hormonal com os compostos estrogênicos. O efeito agonista permite elucidar uma resposta na presença de compostos que mimetizam os efeitos dos hormônios quando ligados ao receptor, já o antagonista inibe a resposta por bloquear o efeito do hormônio (BILA; DEZOTTI, 2007).

A exposição aos desreguladores endócrinos, mesmo em baixas concentrações (ng/L a μ g/L), pode conduzir a efeitos negativos à saúde humana e animal, em virtude da capacidade que os receptores hormonais têm de se ligarem a outros compostos químicos e assim produzir uma resposta (KE et al., 2015). Algumas consequências verificadas por Vos (2000) e Ismail (2017) incluíram a mudança de sexo, redução no crescimento, alteração na reprodução e no comportamento em peixes, mamíferos, répteis e moluscos. Outros efeitos também foram observados por Pal et al. (2010), os quais incluíram baixa fertilidade, ocorrência da modificação sexual e de órgãos reprodutivos de animais aquáticos como peixes e anfíbios.

Os compostos estrogênicos apresentam característica lipofílica e podem bioacumular-se ao longo do tempo de exposição. Desse modo, animais que se

encontram em níveis superiores da cadeia alimentar possuem concentrações mais elevadas de estrogênios no corpo quando comparado aos animais de níveis tróficos inferiores (VILELA; BASSIN; PEIXOTO, 2018).

Em seres humanos, alguns estudos apontam a ocorrência de infertilidade, aumento da incidência de câncer de testículo e redução na qualidade do sêmen em homens, câncer de ovário, mama e útero em mulheres e puberdade precoce (ANNAMALAI; NAMASIVAYAM, 2015; SIFAKIS et al., 2017).

Os hormônios estrogênicos são excretados nos esgotos principalmente por meio de dejetos de animais fêmeos (BILA; DEZOTTI, 2007). Como consequência do intenso lançamento de esgoto em corpos hídricos, alguns desses compostos podem tornar-se persistentes, devido à contínua introdução no ambiente e adsorção a sedimentos (VETHAAK; BELFROID; GRAY, 2002; ZHANG et al., 2017).

Dan Liu et al. (2017) investigaram a ocorrência, distribuição e bioacumulação de compostos desreguladores endócrinos como E2, EE2, BPA, dietilestilbestrol (DES), NP e OP em amostras de água, sedimento e em duas espécies de peixes de um lago na China. O NP foi o mais abundante, com concentrações médias de 70 ng/L na água e 47 ng/g no sedimento. Os autores atribuíram as elevadas concentrações desse composto ao lançamento de esgoto doméstico *in natura* contendo surfactantes e à elevada capacidade de acumulação nos sedimentos. Nas espécies de peixes (*Lateolabrax japonicus* e carpa capim), houve uma diferença na concentração dos compostos analisados, sendo BPA, NP e OP maior em *Lateolabrax japonicus*. Segundo os autores, essa diferença pode estar relacionada à forma corporal e as fontes alimentares do organismo.

A presença dos desreguladores endócrinos E1, E2, E3, EE2, DES, BPA, NP e OP em sedimento de rio também foi determinada por Gong et al. (2011). De acordo com os pesquisadores, NP foi o composto que apresentou maior concentração nas amostras, seguido do BPA e OP. E1 e E2 estavam presentes em 71,4% e 64,3% das amostras de sedimento, respectivamente, e os demais não foram detectados. O descarte de esgoto doméstico e efluente industrial foi o principal fator relacionado à presença dessas substâncias no sedimento.

No Brasil, alguns trabalhos científicos têm relatado a presença dos micropoluentes (E1, E2, EE2, E3, BPA, 4-NP e 4-OP) em águas superficiais (Tabela 1).

Tabela 1 - Desreguladores endócrinos e suas faixas de concentrações encontrados em águas superficiais no Brasil

Micropoluentes	Faixa de concentração (ng/L)	Corpo hídrico	Local	Referências
E1	2,2 a 39	Rio Atibaia	São Paulo	SODRÉ et al. (2010)
E2	< 0,6 a 7,3			
EE2	25			
E3	< 0,6 a 2,3			
BPA	25 a 84			
E1	< 16	Rio Atibaia	São Paulo	MONTAGNER; JARDIM, (2011)
E2	106 a 6,806			
EE2	< 17 a 4,390			
4-NP	< 18			
4-OP	< 21			
BPA	204 a 13,016			
E1	3,2	Rio Doce	Minas Gerais	RODRIGUES et al. (2014)
EE2	0,29 a 0,53			
E1	6,9	Rio Monjolinho	São Paulo	CAMPANHA et al. (2015)
E2	1,85			
EE2	< 0,16			

A ocorrência desses micropoluentes em águas superficiais no Brasil é relatada pelos autores como consequência do lançamento de esgoto no corpo hídrico. Sodré et al. (2010) e Montagner e Jardim (2011), coletaram amostras de água em vários pontos ao longo da bacia hidrográfica do Rio Atibaia em anos subsequentes e encontraram basicamente os mesmos contaminantes. Bisfenol-A foi o micropolvente que apresentou maior concentração nas amostras de água do Rio Atibaia, o que de acordo com os autores indica a contribuição de atividades antrópicas na região estudada, uma vez que esse composto é amplamente utilizado na fabricação de muitos produtos. Por outro lado, o hormônio natural E1 foi o micropolvente mais abundante nas amostras de água do Rio Doce e Monjolinho. De acordo com Campanha et al. (2015) a elevada concentração de E1 comparado aos demais compostos possivelmente pode ser atribuída à degradação de E2 que resulta em E1.

Apesar de alguns estudos abordarem a presença de desreguladores endócrinos em corpos hídricos no Brasil, pouco ainda se sabe sobre a identificação de compostos estrogênicos em diversas matrizes ambientais e seus possíveis efeitos na biota aquática. Assim, o uso de bioensaios e técnicas analíticas vem sendo bastante utilizados.

Determinação da atividade estrogênica em amostras ambientais pelo bioensaio YES

A atividade estrogênica, resposta biológica produzida na presença de um composto estrogênico quando este se liga a um receptor de estrogênio, é considerada um dos principais mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos (BILA, 2005). Em ensaios *in vitro* como o YES (*Yeast Estrogen Screen*) os compostos estrogênicos produzem resposta semelhante ao hormônio 17- β -estradiol, utilizado como padrão de comparação da atividade estrogênica no ensaio.

O ensaio *in vitro* YES, desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), é amplamente aplicado e permite a identificação da atividade estrogênica de forma rápida com elevada sensibilidade e custo moderado. Esse ensaio utiliza uma cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada que contém o gene do receptor de estrogênio humano (REh). O contato desse receptor com compostos que apresentam estrogenicidade induzirá a síntese da enzima β -galactosidase que, por conseguinte, metabolizará o substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG), desencadeando a alteração da cor do meio, de amarelo para rosa, indicando resultado positivo para estrogenicidade (Figura 1).

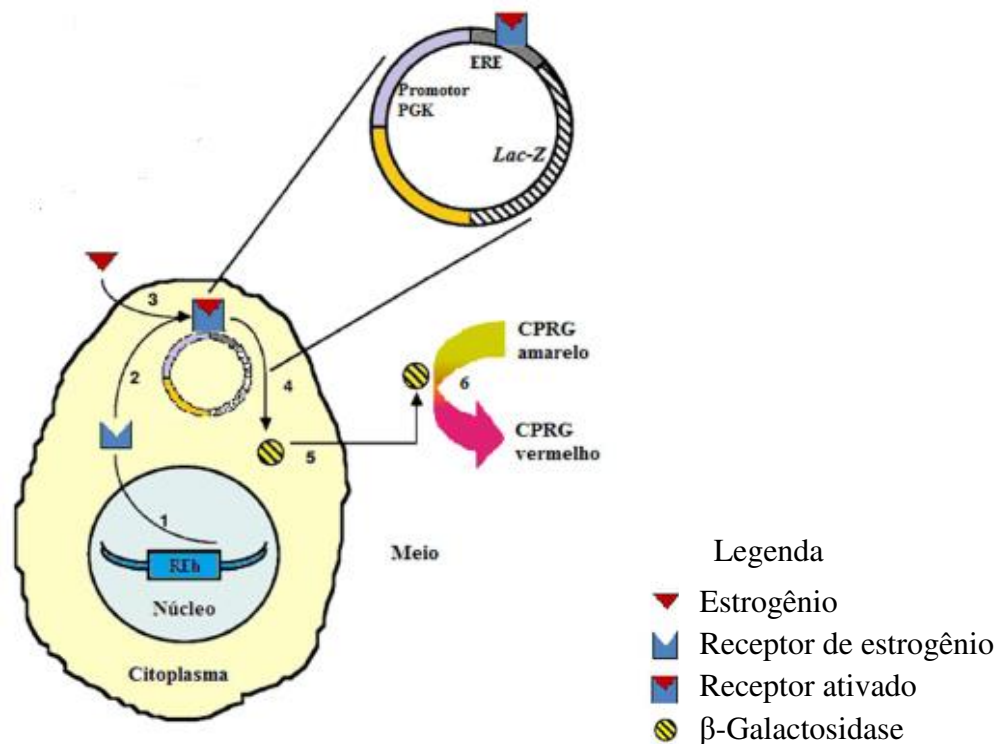


Figura 1 - Representação esquemática da expressão do estrogênio na levedura *S. cerevisiae*. (1) o gene do receptor humano (REh) é integrado no genoma principal e é expresso; (2) acoplado aos elementos de respostas a estrogênios (ERE) no promotor híbrido do plasmídeo de expressão; (3) o receptor é ativado; (4) o estrogênio se liga ao receptor e o gene receptor Lac-Z é expresso; (5) a enzima β -galactosidase produzida é excretada no meio; (6) o substrato cromogênico CPRG (amarelo) é metabolizado pela β -galactosidase em um produto de coloração rosa.

Fonte: Adaptado de Routledge e Sumpter (1996).

Wang et al. (2011) utilizaram o ensaio YES juntamente com a análise química de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para investigar a atividade e os compostos estrogênicos em água e sedimento de rio. No estudo realizado, os autores demonstraram que o bioensaio se mostrou eficaz na determinação da atividade estrogênica, e o método químico, na identificação dos compostos estrogênicos. Também verificaram que somente o emprego da CG-EM não seria capaz de identificar tal atividade na amostra.

No entanto, a determinação da atividade estrogênica em amostras ambientais se torna difícil, uma vez que tais amostras apresentam características complexas e os

compostos são encontrados em concentrações mínimas. Assim, faz-se necessária a concentração desses compostos e purificação da amostra como etapa preliminar à avaliação da estrogenicidade. Essa etapa é denominada de extração em fase sólida (EFS) e consiste na percolação da amostra através de uma resina que adsorve os compostos de interesse.

Devido à elevada sensibilidade do teste YES, a complexidade das amostras ambientais utilizadas nos ensaios e os possíveis efeitos sinérgicos entre os compostos também podem influenciar nos resultados, pois podem afetar o crescimento da levedura durante o teste e fornecer falsos negativos como consequência da presença de toxicidade (FRISCHE et al., 2009).

No estudo realizado por Peck et al. (2004), a presença de substâncias tóxicas inibiu o crescimento da levedura quando avaliaram a atividade estrogênica utilizando o ensaio YES. Amostras de água e sedimento a montante e a jusante de uma estação de tratamento de esgoto foram avaliadas em dois rios na Inglaterra. Os resultados mostraram inibição da levedura em todas as amostras de sedimento coletadas a jusante da estação de tratamento, impossibilitando estimar a atividade estrogênica. Dessa forma, os autores puderam detectar a presença de alguns compostos estrogênicos nessas amostras por meio de CG-EM.

4.4. Antibióticos e resistência microbiana

Os antibióticos têm se tornado uma das mais relevantes classes de micropoluentes dos ambientes aquáticos devido ao elevado consumo desses medicamentos. Além do tratamento e prevenção de infecções na medicina humana e veterinária, o uso de antibióticos tem se mostrado benéfico na agricultura, aquicultura e como promotores de crescimento de suínos, bovinos e aves. (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015; HUANG et al., 2017; GRENNI; ANCONA; BARRA CARACCILO, 2018).

Os antibióticos são agentes quimioterápicos de origem microbiana capazes de anular ou inibir o crescimento microbiano e podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química, mecanismo de ação, espectro de ação e via de administração (GOTHWAL; SHASHIDHAR, 2015). Dentre essas classificações, destaca-se o seu mecanismo de ação contra as bactérias, provocando sua morte (bactericida) ou interrompendo seu crescimento (bacteriostático) (WALSH, 2003). Os mecanismos de ação e os principais antibióticos associados a cada um são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação dos principais antibióticos com base no mecanismo de ação exercido contra bactérias patogênicas

Mecanismo de ação	Classe	Antibiótico
Inibição da síntese de parede celular	Beta-lactâmicos	Penicilinas
		Cefalosporinas
	Polipeptídeos (glicopeptídeos)	Carbapenemas
		Monobactâmicos
Inibição da síntese proteica	Macrolídeos	Eritromicina
		Azitromicina
	Tetraciclina	Claritromicina
		Quinupristina
	Tetraciclina	Dalfopristina
		Telitromicina
	Aminoglicosídeos	Tetraciclina
		Oxatetraciclina
	Oxazolidinomas	Clortetraciclina
		Estreptomicina
Alteração da membrana citoplasmática	Polipeptídeos	Neomicina
		Gentamicina
	Rifamicina	Linezolida
		Polimixina
Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Quinolonas (fluoroquinolonas)	Daptomicina
		Ácido nalidíxico
Inibição da síntese de metabólitos	Sulfonamidas	Ciprofloxacina
		Norfloxacina
	Trimetropima	Novobiocina
	Trimetropima	Gatifloxacina
	Sulfametoxazol	
	Trimetropima	

Fonte: (MADIGAN et al., 2008; TORTORA et al., 2012; VRANAKIS et al., 2014)

Os fármacos não são completamente metabolizados pelo organismo sendo excretados por humanos e animais por meio de urina e fezes e, no caso dos esgotos sanitários, são removidos parcialmente nas estações de tratamento. Assim a contaminação dos recursos hídricos por antibióticos se deve, principalmente, a águas residuárias urbanas, industriais e agrícolas (CARVALHO; SANTOS, 2016; KUMAR; PAL, 2018). Além disso, o uso de estrume como fertilizante em áreas agrícolas pode

levar à lixiviação dos fármacos ao ambiente aquático pelo escoamento superficial (CARVALHO; SANTOS, 2016).

Atualmente, a presença de antibióticos em corpos hídricos receptores é considerada uma das maiores preocupações de saúde pública, devido ao desenvolvimento de bactérias com genes de resistência (KUMAR; PAL, 2018). A resistência microbiana corresponde à capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos na presença de antibióticos aos quais são normalmente sensíveis (GRENNI; ANCONA; BARRA CARACCILO, 2018). O desenvolvimento da resistência é em grande parte consequência do uso excessivo e descarte inapropriado de antibióticos, fazendo com que o microrganismo sofra mutações desenvolvendo mecanismos de ação contra o medicamento ou o adquira por processo adaptativo natural (SANDERSON et al., 2016).

Os principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias contra a ação dos antimicrobianos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Mecanismos de resistência bacteriana, principais antibióticos e microrganismos afetados

Mecanismo de ação	Antibióticos	Presença do mecanismo
Presença de membrana impermeável	Penicilinas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Bactérias entéricas
Produção de enzimas capazes de inativar o antibiótico por modificação ou degradação	Penicilinas	<i>Staphylococcus aureus</i>
		Bactérias entéricas
	Cloranfenicol	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
Alteração do alvo celular	Aminoglicosídeos	Bactérias entéricas
	Eritromicina	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Rifamicina	Bactérias entéricas
	Estreptomicina	Bactérias entéricas
		<i>Staphylococcus aureus</i>
Expulsão do antibiótico para fora da célula por meio de bomba de efluxo	Tetracilina	Bactérias entéricas
	Cloranfenicol	<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
	Eritromicina	<i>Staphylococcus spp.</i>

Fonte: (MADIGAN et al., 2008; KUMAR; PAL, 2018)

A presença de membrana impermeável impede o antibiótico de alcançar o sítio de atuação devido à baixa permeabilidade, como consequência da modificação das proteínas da membrana externa (porinas) que dificulta a entrada do antibiótico (MUNITA; ARIAS, 2016). Já o mecanismo enzimático utiliza enzimas produzidas pelas bactérias para inativar a função do antibiótico. Dentre essas enzimas, destaca-se a β -lactamase que destrói o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas (MUNITA; ARIAS, 2016). Outro mecanismo de resistência é a alteração do alvo celular, que reduz a afinidade do antibiótico pelo sítio alvo, impossibilitando a ação contra o microrganismo. Além desses, a bomba de efluxo também é um importante mecanismo de resistência, que possibilita a expulsão do antibiótico do meio intra para o meio extracelular por intermédio de proteínas de membrana e pode ser um mecanismo capaz de conferir resistência a múltiplos antibióticos simultaneamente (DŽIDIĆ; ŠUŠKOVIĆ; KOS, 2008).

A resistência desenvolvida pelas bactérias como mecanismo de defesa se torna eficaz contra vários tipos de antibióticos, fazendo com que elas resistam à ação de múltiplos antibióticos contidos no ambiente (KUMAR; PAL, 2018; QIAO et al., 2018). Högberg et al. (2010) destacam *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* como bactérias resistentes a múltiplos antibióticos.

Outro importante mecanismo que pode tornar as bactérias resistentes é a transferência horizontal de genes que permite a disseminação da resistência entre diferentes espécies bacterianas por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e/ou integrons, que pode ocorrer por conjugação, transdução ou transformação (GOTHWAL; SHASHIDHAR, 2015). Dessa forma, genes de resistência a antibióticos (GRA) podem disseminar facilmente e bactérias podem adquirir genes de resistência e transferir para comunidades bacterianas por meio de elementos genéticos móveis (CARTER et al., 2018). O conjunto de genes que conferem resistência bacteriana aos antibióticos denomina-se resistoma (WRIGHT, 2010).

Assim, a resistência bacteriana pode ser considerada um contaminante devido à disseminação da resistência a antibióticos por unidades de transferência de genes que exercem uma pressão seletiva no ecossistema natural e pela presença de bactérias contidas em águas residuárias capazes de propagar tal resistência, uma vez que apresentam elevada densidade microbiana, nutrientes e concentrações significantes de antibióticos, sendo, portanto, um ambiente favorável para a proliferação de GRA (MARTINEZ, 2009, QIAO et al., 2018).

Proia et al. (2018) investigaram a presença de antibióticos, bactérias resistentes como *E. coli* e genes de resistência ao longo de um rio urbano na Bélgica impactado pelo lançamento de esgoto. Foi verificada a presença de *E. coli* e bactérias heterotróficas resistentes a montante do ponto de lançamento, o que, segundo os autores, pôde ser atribuído ao escoamento das áreas de pastagem e ocupação da bacia hidrográfica. Além disso, os autores observaram que as atividades antrópicas poderiam contribuir para o aumento dos níveis de genes de resistência aos antibióticos ao longo do rio.

Wang et al. (2018) avaliaram a poluição por antibióticos por meio de elementos genéticos móveis, bactérias e genes de resistência em águas residuárias *in natura* de três hospitais na China. Segundo os autores, quinolonas, tetraciclina e cefalexina foram os antibióticos encontrados em maiores concentrações nas águas residuárias provenientes dos três hospitais. Também foram encontradas populações de bactérias resistentes a múltiplas drogas, com predominância de *Escherichia* e *Acinetobacter*, que continham vários genes que conferiram resistência a antibióticos, além de elementos genéticos móveis como integrons e transposons. Os pesquisadores concluíram que dejetos humanos podem ser uma fonte para a disseminação de antimicrobianos, o que implica, no aumento dos perigos para o ambiente e para a saúde animal.

Como forma de detectar e quantificar a presença de genes de resistência a antibióticos em amostras ambientais, vários métodos baseados em técnicas moleculares independentes de cultivo microbiano têm sido utilizados, como PCR, PCR quantitativo e metagenômica (MARTI; JOFRE; BALCAZAR, 2013; BELL et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2017). Dentre essas, a análise metagenômica tem se tornado uma ferramenta promissora ao permitir uma análise mais profunda e completa da diversidade de bactérias e de GRA, presentes em diferentes amostras ambientais. (SHI et al., 2013).

Metagenômica como ferramenta na identificação de genes de resistência a antibióticos

Estudos da diversidade microbiana baseados em técnicas independentes de cultivo mostram que as técnicas de microbiologia tradicionais abrangem apenas uma pequena porcentagem de espécies bacterianas em amostras ambientais (STREIT; SCHMITZ, 2004). Tal resultado se deve, principalmente, à dificuldade de identificar as condições necessárias para o cultivo em laboratório de todos os microrganismos, assim muitos ainda não são cultiváveis.

Dentre as técnicas independentes de cultivo, a metagenômica consiste na análise genética direta de todos os genomas (metagenoma) presentes em amostras ambientais, proporcionando acesso à composição taxonômica e funcional das comunidades microbianas sem a necessidade prévia de cultivo em laboratório (THOMAS et al., 2012). Essa análise permite identificar novos microrganismos e genes presentes nas amostras ambientais, além daqueles já conhecidos, possibilitando um maior esclarecimento de questões ecológicas e evolutivas (SIMON; DANIEL, 2011).

Nos últimos anos, a metagenômica combinada com o sequenciamento de nova geração tem sido explorada para identificação de genes de resistência a antibióticos em uma ampla variedade de ambientes, se mostrando altamente eficaz na obtenção de grandes quantidades de sequências de DNA de forma rápida e sem a necessidade de clonagem (MEYER et al., 2008; SHI et al., 2013; ZHANG et al., 2017). Essa análise baseia-se no sequenciamento *shotgun* do DNA total extraído da amostra, permitindo um estudo do conteúdo taxonômico e funcional da comunidade microbiana (BENGTSSON-PALME et al., 2016).

No sequenciamento *shotgun*, o DNA é todo fragmentado e os fragmentos sequenciados independentemente, resultando em um grande número de sequências (*reads*) para anotação (SHARPTON, 2014). Essa metodologia é considerada a melhor para o estudo de grandes comunidades de microrganismos ainda não caracterizada (TANENBAUM et al., 2010). No entanto, essa abordagem ainda é considerada desafiadora, devido à complexidade das amostras ambientais e quantidade de dados gerados (SHARPTON, 2014).

Marathe et al. (2017) utilizaram o sequenciamento *shotgun* do metagenoma para investigar o impacto da poluição por esgoto bruto e parcialmente tratado na presença de GRA e na composição da microbiota do sedimento de um rio, antes e após um centro urbano na Índia. O estudo permitiu identificar a abundância de genes de resistência codificando uma variedade de classes de antibióticos nas amostras coletadas no ponto

de lançamento após a cidade. Foram detectados genes de resistência a cloranfenicol, macrolídeos, tetraciclina, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas e trimetoprim. A composição da microbiota do sedimento apresentou abundância do gênero *Acinetobacter* resistente a múltiplos antibióticos, nas amostras coletadas após o centro urbano, atingindo 29% do total de *reads*. De acordo com os autores, o descarte de esgoto pode contribuir significativamente para o aumento de GRA no ambiente impactado.

Tang et al. (2016) empregaram análises metagenômicas utilizando sequenciamento de nova geração para avaliar a comunidade bacteriana e os GRA no corpo hídrico receptor antes e após passar por uma estação de tratamento de esgoto na China. Os resultados apontaram a dominância do filo Proteobacteria em todas as amostras. Genes de resistência a tetraciclina e β -lactâmicos foram encontrados nas amostras de efluentes brutos e tratados, respectivamente. Também foram detectados genes de resistência a polipetídeos e múltiplos fármacos em pontos de coleta ao longo do corpo hídrico, o que, de acordo com os autores, pode ser explicado pela possibilidade dos genes de resistência serem transmitidos em diferentes microrganismos por meio da transferência horizontal.

Dessa forma, a metagenômica tem se mostrado uma poderosa ferramenta na identificação de genes e caracterização de comunidades bacterianas resistentes a antibióticos, além de possibilitar a descoberta de novos microrganismos e genes de resistência em diversos tipos de ambientes, dos quais se destacam água e sedimento de corpos hídricos receptores de esgotos.

4.5. Ensaio ecotoxicológicos

Métodos químicos, como as análises cromatográficas, são amplamente utilizados para identificação e quantificação de micropoluentes. No entanto, esses métodos não são adequados para determinar os efeitos nocivos provocados à vida aquática como consequência da contaminação por esses compostos (GALASSI; GUZZELLA; CROCE, 2004). Dessa forma, o uso de ensaios ecotoxicológicos se mostra imprescindível para detectar e avaliar efeitos adversos provocados à comunidade aquática na presença de contaminantes tóxicos.

Apesar dos ensaios ecotoxicológicos não identificarem o composto responsável pela contaminação, eles permitem determinar a presença ou ausência de efeitos tóxicos agudos ou crônicos nos organismos durante o tempo de exposição (ZAGATTO e

BERTOLETTI, 2006). Vigano (2000) ressalta que os efeitos tóxicos agudos dificilmente ocorrem em corpos hídricos receptores, devido à elevada vazão de água que é capaz de diluir os compostos químicos a baixas concentrações, resultando em efeitos crônicos.

Nos sedimentos também é possível verificar efeitos ecotoxicológicos provocados pela contaminação do ambiente aquático. Porém, a interação entre o sedimento e o composto pode dificultar sua determinação. Muitos contaminantes podem ficar aderidos nos sedimentos por um longo período de tempo, tornando-se biodisponíveis conforme variações das condições hidrológicas (DE CASTRO-CATALÀ et al., 2016).

Organismos de diferentes níveis tróficos como, por exemplo, algas, crustáceos e peixes são muito utilizados como bioindicadores em testes ecotoxicológicos. O uso desses organismos se deve principalmente à elevada sensibilidade que apresentam a uma gama de compostos químicos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). É recomendado pela Resolução CONAMA 430/2011 que os ensaios ecotoxicológicos em efluentes sejam realizados utilizando, no mínimo, organismos de dois níveis tróficos para garantir maior confiabilidade nos ensaios (BRASIL, 2011).

A toxicidade crônica foi avaliada por Kallqvist et al. (2008) na água e sedimento de um rio contaminado por compostos orgânicos e inorgânicos. Foi constatado efeito crônico ao organismo teste *Pseudokirchneriella subcapitata* (atualmente *Raphidocelis subcapitata*) em praticamente todas as amostras analisadas. Os pesquisadores submeteram as amostras à análise de CG-EM e identificaram uma ampla variedade de contaminantes emergentes como fármacos, desreguladores endócrinos, produtos de cuidado pessoal, entre outros, que poderiam ser os responsáveis pelos efeitos tóxicos observados nas amostras.

No Brasil, a Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) inclui a toxicidade no que se refere às condições e padrões de qualidade das águas superficiais. De acordo com a Resolução, ensaios ecotoxicológicos deverão ser aplicados quando as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes, não listados na Resolução, forem prováveis de causar danos aos seres vivos. A Resolução também estabelece critérios para a qualidade da água visando a proteção das comunidades aquáticas, não permitindo a detecção de efeito tóxico crônico em corpos hídricos que se enquadram nas classes 1 e 2, e ausência de efeito agudo para águas de classe 3. Em complementação a Resolução CONAMA 357/05, a Resolução CONAMA 430 de 2011, que também dispõe das condições e padrões de lançamento de efluente em corpos

hídricos receptores, ressalta que “o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente” (BRASIL, 2011).

Vários estudos têm abordado testes ecotoxicológicos em águas e sedimentos de cursos d’água impactados por inúmeras fontes poluidoras. Recentemente, devido à grande incidência de CPE no ambiente aquático, o uso de ensaios ecotoxicológicos tem se tornado uma ferramenta importante na determinação dos efeitos provocados por esses contaminantes na biota aquática (DESTRIEUX et al., 2017; SANTOS et al., 2010).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no município de Viçosa, localizado na porção norte da Zona da Mata mineira, entre as coordenadas geográficas 20°45'14'' latitude sul e 42°52'55'' longitude oeste, altitude de 648 m, área de 300,2 km² e população estimada de 78.381 habitantes (IBGE, 2017). A área de estudo compreendeu a microbacia hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu (5.500 ha), subafluente do Rio Piranga, uma sub-bacia do Rio Doce, localizada integralmente no município (Figura 2).

O Ribeirão São Bartolomeu inicia seu percurso a montante do campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e do centro urbano do município. Essa região é caracterizada pelo desenvolvimento de atividades agropecuárias por produtores rurais e, recentemente, pela expansão urbana com loteamentos e residências.

No campus universitário, o Ribeirão recebe cinco barramentos consecutivos, sendo as duas primeiras represas funcionando como reservatórios de acumulação e a segunda como fonte de captação de água para abastecimento da UFV e de parte da cidade. Ao longo do seu percurso após passar pelo campus da UFV, o Ribeirão São Bartolomeu recebe praticamente todo o esgoto oriundo do município e se integra ao Rio Turvo Sujo na região conhecida como Barrinha, após passar pelo núcleo urbano da cidade. O Rio Turvo Sujo encontra-se com o Rio Turvo Limpo, na localidade conhecida como Duas Barras.

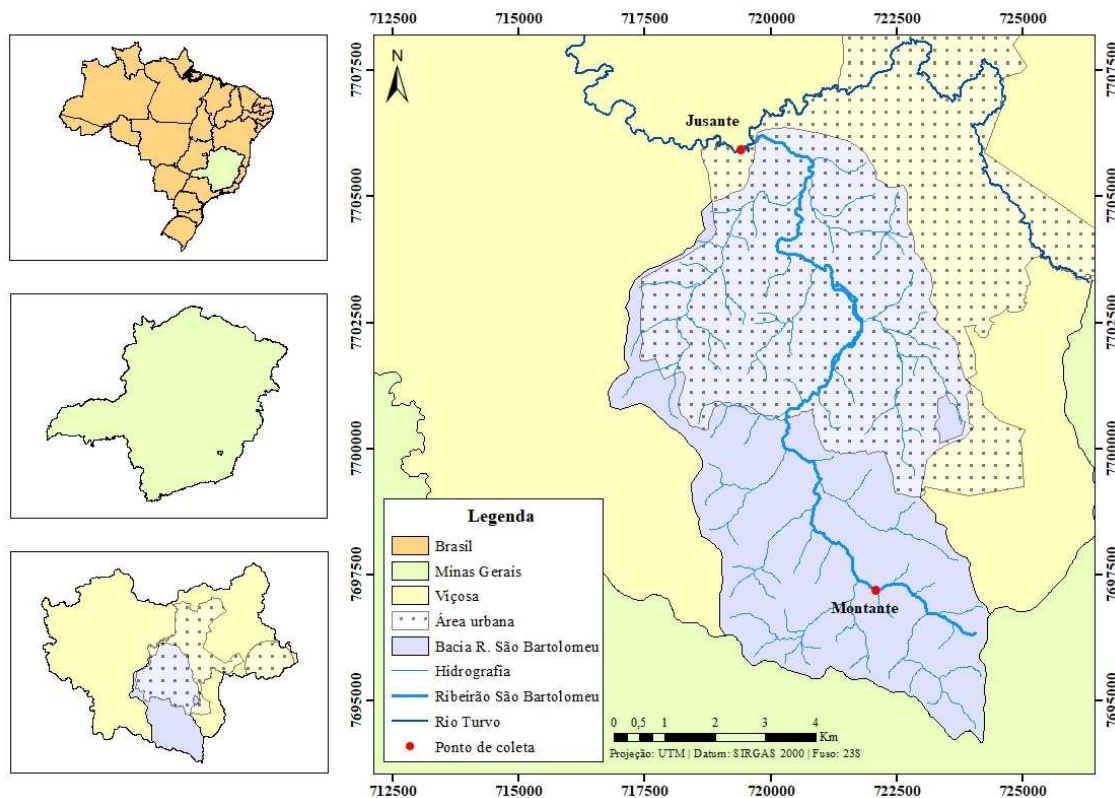


Figura 2 - Microbacia hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu e localização dos pontos de coleta de amostras a montante (Palmital) e a jusante (Barrinha) do núcleo urbano de Viçosa.

5.2. Coleta e preservação das amostras

Amostras foram coletadas mensalmente em dois pontos da microbacia, entre os meses de janeiro e agosto de 2017. O primeiro ponto foi no Ribeirão São Bartolomeu, em um curso d'água localizado no bairro Palmital, região a montante do campus da UFV e da zona urbana de Viçosa (Figura 3a). O segundo ponto foi o Rio Turvo Sujo no bairro Barrinha, a jusante do ponto de descarga do interceptor de esgotos da zona urbana de Viçosa, incluindo os da UFV (Figura 3b). Os pontos de amostragem foram escolhidos para comparar a qualidade da água e do sedimento a montante e a jusante do município e avaliar o impacto do lançamento de esgoto *in natura* sobre o corpo hídrico receptor, com ênfase em efeitos causados pelos CPE. As análises de GRA foram realizadas apenas com as amostras coletadas nos meses de abril e julho.



Figura 3 - Ribeirão São Bartolomeu a montante (a) e Rio Turvo Sujo a jusante (b) do município de Viçosa. Fonte: autoria própria.

O período de amostragem compreendeu variações sazonais de verão e inverno e foi caracterizado por apresentar seca intensa e vazões reduzidas do Ribeirão São Bartolomeu, conforme medições realizadas pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) de Viçosa (Figura 4). A vazão do Rio Turvo Sujo foi medida uma vez pelo IGAM durante o período monitorado e apresentou vazão igual a 939 L/s, em março.

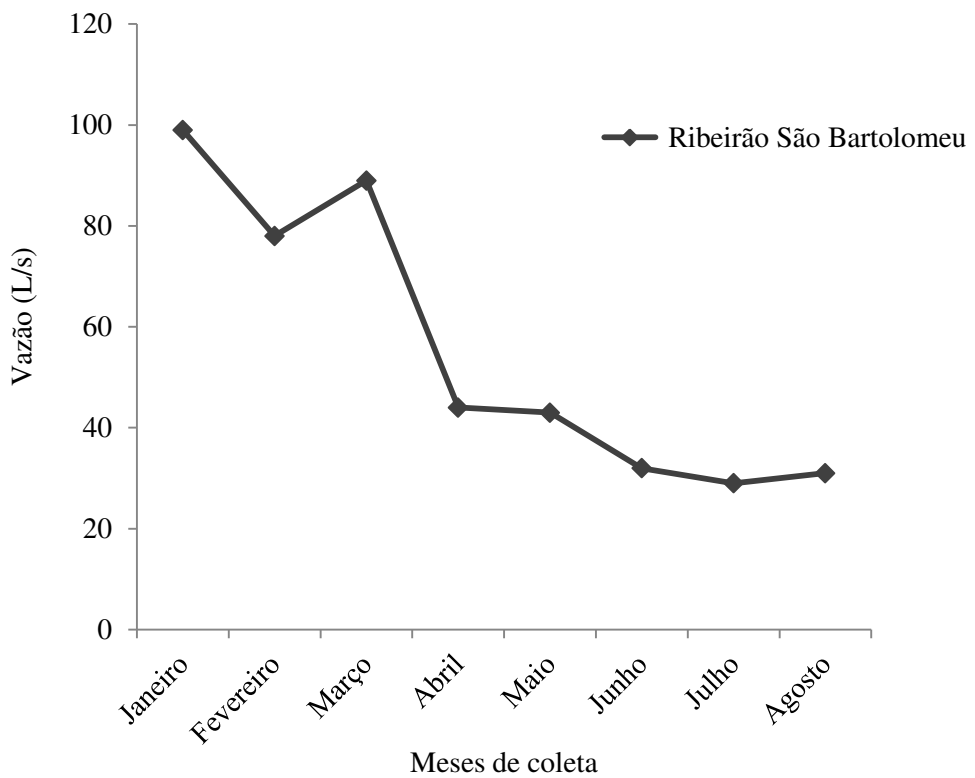


Figura 4 - Vazão do Ribeirão São Bartolomeu de janeiro a agosto de 2017 (SAAE, Viçosa).

O planejamento experimental está resumido no fluxograma da Figura 5.

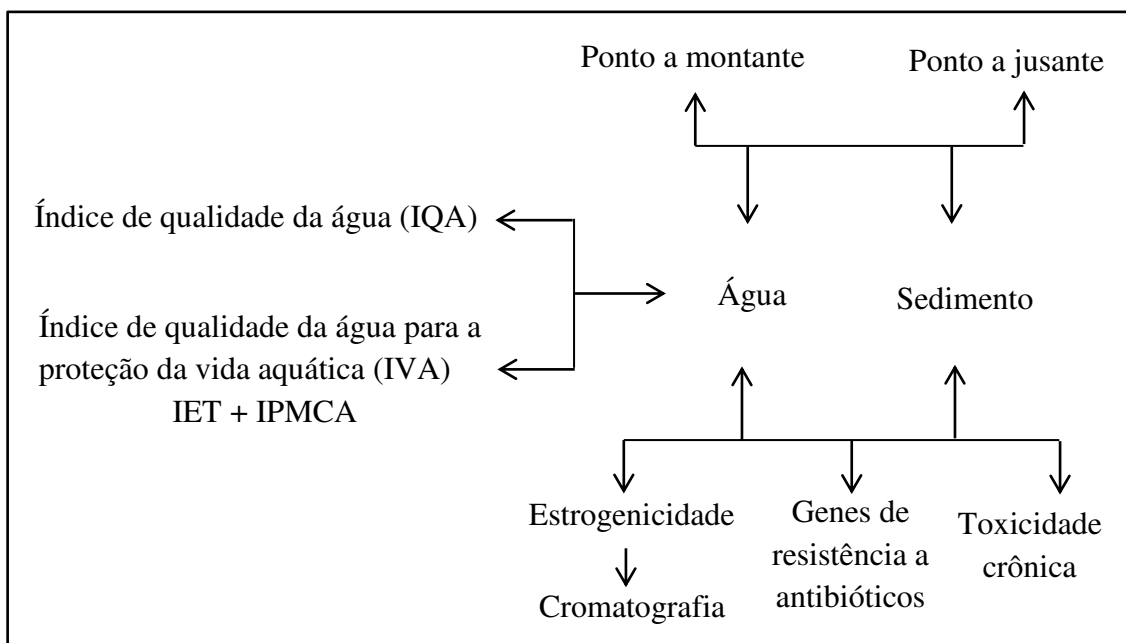


Figura 5 - Planejamento experimental do desenvolvimento da pesquisa.

As amostras de água (10 L) foram coletadas na margem dos rios com o auxílio de um coletor de polietileno e armazenadas em frascos de vidro âmbar previamente lavados com solução de ácido clorídrico (1:1) e enxaguados em seguida com água da torneira e água destilada. Para a análise de *Escherichia coli*, a coleta foi realizada utilizando-se frascos de vidro estéril com capacidade de 100 mL. As coletas das amostras de água para o teste de toxicidade foram feitas em frascos de polietileno previamente lavados com solução de ácido clorídrico 10% e enxaguados exaustivamente com água de torneira e água destilada.

Os sedimentos (500 g) foram coletados na margem dos rios a aproximadamente 30 cm de profundidade, utilizando-se draga Petersen de aço inox e armazenados em potes de polietileno seguindo o mesmo critério de limpeza dos frascos de coleta e armazenagem das amostras de água.

Todo o material coletado foi mantido em caixas de isopor para o transporte até o laboratório onde foi refrigerado a 4°C até a execução das análises, seguindo as recomendações e prazos previstos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). As amostras para testes de toxicidade foram armazenadas em freezer a -20°C até a realização dos testes conforme previsto na norma NBR 13373 (ABNT, 2017).

5.3. Avaliação da qualidade da água por meio de índices numéricos

5.3.1. Índice de qualidade da água – IQA

A qualidade da água foi avaliada de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo IGAM para as águas superficiais do estado de Minas Gerais (IGAM, 2004). Os parâmetros físicos, químicos e microbiológico para a caracterização do IQA são apresentados na Tabela 4, juntamente com os respectivos métodos e equipamentos utilizados. As medições de OD e temperatura foram realizadas “*in loco*”. A execução das análises seguiu os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Tabela 4 - Parâmetros físicos, químicos e microbiológico e respectivos métodos e equipamentos utilizados na determinação do IQA

Parâmetro	Método	Equipamento
OD	APHA 5400 G	Oxímetro Digimed DM-4P
pH	APHA 4500 H ⁺ B	pHmetro Digimed DM-20
Temperatura	APHA 2550 B	Digimed DM-4P
Nitrato	APHA 4500 A	Espectrofotômetro HACH DR-3800
Fósforo total	APHA 4500 P	Espectrofotômetro HACH DR-3800
Sólidos totais	APHA 2540 D	Banho maria- Centauro CBM-08 ^a
Turbidez	APHA 2130 B	Nefelômetro Turbidity Meter TD-300
DBO	APHA 5210 D	Incubadora B.O.D. SL- 200/300
<i>E. coli</i>	APHA 9223 A	Colilert - IDEXX

A cada parâmetro foi atribuído um peso (w_i), de acordo com a importância no cálculo do IQA, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Pesos atribuídos aos parâmetros de avaliação da qualidade da água para o cálculo do IQA

Parâmetro	Peso (w_i)
OD (% OD Saturado)	0,17
<i>E. coli</i> (NMP/100mL)	0,15
pH	0,12
DBO (mg/L)	0,10
Nitrato (mg/L NO ₃ ⁻)	0,10
Fósforo total (mg/L PO ₄ ⁻²)	0,10
Variação da Temperatura (°C)	0,10
Turbidez (UNT)	0,08
Sólidos Totais (mg/L)	0,08

Fonte: IGAM (2004)

A qualidade dos parâmetros (q_i) utilizados no cálculo do IQA foi determinada com base nas curvas disponibilizadas em relatórios do Ministério do Meio Ambiente e da Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável de Minas Gerais (MMA e SEMAD 2005) e o IQA calculado como o produtório ponderado dos valores de q_i (equação 1):

$$IQA = \prod_{i=1}^9 q_i^{w_i} \quad \text{eq. 1}$$

sendo:

IQA = índice de qualidade da água;

q_i = qualidade do parâmetro i , obtida pela curva específica do parâmetro; e

w_i = peso atribuído ao parâmetro (Tabela 5).

Os valores do IQA foram classificados para determinar a qualidade da água, conforme apresentado na Tabela 6 (IGAM, 2004).

Tabela 6 - Classificação dos valores de IQA

Valor do IQA	Qualidade da água
> 90 a 100	Excelente
> 70 a 90	Bom
> 50 a 70	Médio
> 25 a 50	Ruim
≤ 25	Muito Ruim

Fonte: IGAM (2004)

Para os meses de janeiro e fevereiro, nos quais não foram obtidos os valores de DBO, utilizou-se a metodologia proposta por Srivastava e Kumar (2013), conforme a equação 2:

$$IQA = \frac{\sum w_y Q_y}{\sum w_y} \quad \text{eq.2}$$

sendo:

y = parâmetro disponível

Q = qualidade do parâmetro obtida pela curva específica do parâmetro disponível

W = peso atribuído ao parâmetro disponível

5.3.2. Índice de qualidade da água para a proteção da vida aquática – IVA

Para avaliar a qualidade da água visando a proteção da fauna e da flora aquáticas foi utilizado o IVA, composto pelo IPMCA e IET, proposto pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2010).

Para o IPMCA foram quantificados o grupo de variáveis essenciais (VE) e o grupo de substâncias tóxicas (ST), conforme parâmetros e métodos descritos na Tabela 7. As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos estabelecidos pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 1994; USEPA, 2007), *Water Analysis Handbook* 6th ed. Hack Company (WAH, 2011), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012) e NBR 13373 (ABNT, 2010). Os surfactantes foram quantificados com kit comercial (TNT 874, Hach) e os metais por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES).

Tabela 7 - Parâmetros e métodos utilizados na determinação do IPMCA

IPMCA	Parâmetro	Método
Variáveis essenciais (VE)	OD	APHA 5400 G
	pH	APHA 4500 H ⁺ B
	Toxicidade	NBR 13373(ABNT 2010)
Substâncias Tóxicas (ST)	Cádmio	USEPA 6010 C
	Cromo	USEPA 6010 C
	Chumbo	USEPA 6010 C
	Níquel	USEPA 6010 C
	Mercúrio	USEPA 7470 A
	Cobre	WAH 8506
	Zinco	WAH 8009
Surfactantes	TNT 874 Hach	

A cada parâmetro foi atribuído um peso de 1 a 3, de acordo com o nível em que seu valor se encontrou (Anexo A – Tabela A1). O IPMCA foi calculado utilizando a equação 3 (CETESB, 2010):

$$\text{IPMCA} = \text{VE} \times \text{ST} \quad \text{eq.3}$$

sendo:

VE = valor da maior ponderação entre os parâmetros que compõe as variáveis essenciais; e

ST = valor da maior ponderação entre os parâmetros que compõe o grupo das substâncias tóxicas.

Os valores do IPMCA foram classificados para definir a qualidade da água conforme apresentado na Tabela 8 (CETESB, 2010).

Tabela 8 - Classificação do IPMCA em níveis de qualidade da água

Valor do IPMCA	Qualidade da água
1	Boa
2	Regular
3 e 4	Ruim
≥ 6	Péssima

Fonte: CETESB (2010)

O IET compreendeu o índice de estado trófico (Carlson, 1977 modificado por Lamparelli, 2004) para fósforo total e clorofila *a*, quantificada pelo método 10200 H (APHA, 2012). As equações 4 e 5, utilizadas no cálculo do IET, foram estabelecidas para ambientes lóticos (CETESB, 2010).

$$IET(Cl) = 10 \times \left(6 - \left(\frac{-0,7 - 0,6 \times (\ln Cl)}{\ln 2} \right) \right) - 20 \quad \text{eq.4}$$

$$IET(PT) = 10 \times \left(6 - \left(\frac{0,42 - 0,36 \times (\ln PT)}{\ln 2} \right) \right) - 20 \quad \text{eq.5}$$

sendo:

IET (Cl) = concentração de clorofila a ($\mu\text{g/L}$); e

IET (PT) = concentração de fósforo total ($\mu\text{g/L}$).

O IET foi calculado como a média aritmética simples dos valores de IET (Cl) e IET (PT). Os valores de IET foram classificados em níveis de qualidade e os níveis ponderados para fins de cálculo do IVA, conforme apresentado na Tabela 9 (CETESB, 2010).

Tabela 9 - Classificação do IET para rios e ponderação do nível de trofia para fins de cálculo do IVA

Valor do IET	Nível de trofia	Ponderação
≤ 47	Ultraoligotrófico	0,5
> 47 a 52	Oligotrófico	1
> 52 a 59	Mesotrófico	2
> 59 a 63	Eutrófico	3
> 63 a 67	Supereutrófico	4
> 67	Hipereutrófico	5

Fonte: CETESB (2010)

O IVA foi calculado pela equação 6 e a classificação dos valores do IVA realizada conforme apresentado na Tabela 10 (CETESB, 2010).

$$\text{IVA} = (\text{IPMCA} \times 1,2) + \text{IET} \quad \text{eq. 6}$$

onde:

IPMCA = valor do IPMCA

IET = valor da ponderação do IET (Tabela 9)

Tabela 10 - Classificação dos valores de IVA em níveis de qualidade da água

Valor do IVA	Qualidade da água
$\leq 2,5$	Ótima
2,6 a 3,3	Boa
3,4 a 4,5	Regular
4,6 a 6,7	Ruim
$\geq 6,8$	Péssima

Fonte: CETESB (2010)

Os resultados das análises físicas, químicas e microbiológicas utilizadas nos cálculos do IQA e IVA também foram comparados com os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 de 2005 para águas doces enquadradas na classe 2.

Os valores médios de IQA e IVA nos pontos de amostragem a montante e a jusante foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software R (R Core Team, 2017).

5.4. Atividade estrogênica

5.4.1. Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas na coleta e preparo das amostras foram lavadas previamente com o detergente não iônico Extran® 12,5%, em seguida enxaguadas com água da torneira e água destilada. Posteriormente, as vidrarias foram imersas em solução de ácido nítrico 10% durante 24h e em seguida enxaguadas exaustivamente com água da torneira e água destilada.

5.4.2. Preparo das amostras

As amostras de água foram filtradas (membrana de acetato de celulose, 0,45 μm) e tiveram seu pH ajustado para $2,0 \pm 2$ com solução de ácido clorídrico (HCl) 3M. As amostras de sedimento foram extraídas conforme a metodologia proposta por vários autores (DE ALDA; BARCELO, 2001; LIU; ZHOU; WILDING, 2004; PECK et al., 2004; VIGANÒ et al., 2008) com modificações. Inicialmente, secou-se o sedimento em

estufa a 60°C durante 24h. O sedimento seco foi passado por uma peneira de 1.18 mm e 10 g do sedimento seco foram misturados a 10 mL de metanol e a mistura agitada durante 5 minutos em agitador tipo vortex (KASVI-K40 10208). Em seguida, o material foi centrifugado a 2500 g por 5 minutos e o sobrenadante vertido em balão volumétrico de 200 mL. O processo de adição do metanol, agitação, centrifugação e coleta do sobrenadante foi repetido três vezes e o balão volumétrico completado até a marca de 200 mL com água ultrapura. Em seguida procedeu-se os mesmos passos de filtração e ajuste do pH das amostras de água.

5.4.3. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) foi realizada com cartucho C18 (500 mg x 6 mL, C-18, Agilent Technologies®) em sistema Manifold conectado a uma bomba de vácuo. Os cartuchos foram previamente condicionados de acordo com Bila e Dezotti (2007), passando-se 3 x 2 mL de hexano, 1 x 2 mL de acetona, 3 x 2 mL de metanol e, por último, lavados com 5 x 2 mL de água ultrapura (Sistema Direct-Q, Millipore) com pH ajustado para 3. As amostras foram passadas nos cartuchos sob vácuo com gotejamento contínuo e vazão de aproximadamente 10 mL/min, impedindo-se que a fase sólida do cartucho secasse. Terminada a extração, o extrato foi eluído passando-se 4 x 1 mL de acetona pelo cartucho. A acetona foi totalmente evaporada em temperatura ambiente ou sob fluxo de nitrogênio gasoso (N_{2(g)}) e por fim, os extratos foram ressuspensos em 1 mL de etanol absoluto, grau HPLC para utilização no ensaio YES.

5.4.4. Ensaio *in vitro* YES

A atividade estrogênica foi quantificada pelo ensaio YES conforme o protocolo desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações.

Os ensaios YES foram realizados no Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental – LESA da UFV. Todos os materiais e soluções utilizados no ensaio foram manipulados sob condições estéreis. As análises foram realizadas em duplicata em microplacas de 96 poços e os extratos das amostras diluídos serialmente na proporção de 1:2 em etanol (grau HPLC). A diluição da curva seguiu os mesmos procedimentos das amostras, porém utilizando a solução de 17-β-estradiol (54,48 µg/L, 0,2 µM) como substância de referência.

As diluições foram feitas intercalando as amostras ou solução de 17- β -estradiol com os brancos (controle negativo) para evitar contaminação cruzada (Figura 6).

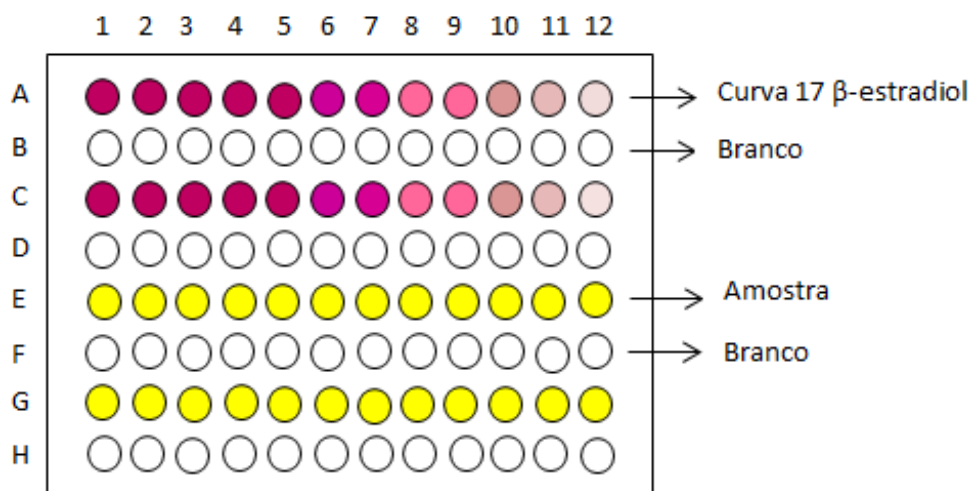


Figura 6 - Esquema da microplaca de 96 poços com distribuição das replicatas da curva de 17- β -estradiol e amostras intercaladas com o branco.

Após a diluição, 10 μ L de cada poço foram transferidos para a placa de análise. Essa alíquota foi deixada evaporar completamente e em seguida foram adicionados 200 μ L da solução teste contendo o meio de cultivo, a solução de CPRG e o meio com a cultura da levedura *S. cerevisiae*. Terminada a montagem da placa de análise, esta foi fechada e lacrada com fita crepe, agitada por 2 minutos em agitador de placas de 96 poços (KASVI-K40 10208) e incubadas a 30°C durante 72 horas. Após o período de incubação foi possível verificar o crescimento da levedura devido ao aumento da turbidez e, quando constatada a presença de atividade estrogênica, a alteração na coloração dos poços de amarelo para rosa em consequência da produção da enzima β -galactosidase. A leitura da placa foi feita em uma leitora de microplacas de 96 poços (Celer® Polaris) nos comprimentos de onda de 540 nm para cor e 630 nm para turbidez.

Os valores de absorbância foram corrigidos, conforme indicado na equação 7.

$$Abs_{\text{corrigida Amostra}} = Abs_{540 \text{ Amostra}} - (Abs_{630 \text{ Amostra}} - Abs_{630 \text{ Branco}}) \quad \text{eq.7}$$

As curvas de absorvâncias corrigidas foram comparadas à curva padrão construída com o 17-β-estradiol (controle positivo), utilizando o software Origin® 8.0 para determinar a concentração equivalente de 17-β-estradiol (EQ-E₂, ng/L). Detalhes da quantificação são mostrados no Anexo B.

Nas amostras que apresentaram inibição do crescimento da levedura devido à presença de toxicidade, utilizou-se a relação proposta por Frische et al. (2009). Essa relação possibilitou comparar a média das absorvâncias de 630 nm das diluições das amostras com as médias dos controles negativos, sendo o resultado expresso em porcentagem de inibição (equação 8).

$$\text{Inibição} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{630} \text{ amostra}}{\text{Abs}_{630} \text{ branco}}\right) \times 100 \quad \text{eq.8}$$

As placas e todos os materiais que estiveram em contato com a levedura foram autoclavados a 121°C por 20 minutos antes de serem descartados.

5.4.5. Avaliação da eficiência do método de EFS

Para avaliar a eficiência do processo de EFS, foi feita a validação do método pela recuperação do micropoluinte 17-β-estradiol. Adicionou-se uma concentração conhecida de 10 ng/L de 17-β-estradiol em 200 mL de água destilada, realizando todos os procedimentos de condicionamento do cartucho descritos anteriormente e procedeu-se com a EFS. Após a eluição com 4 mL de acetona, as amostras foram secas em N_{2(g)}, ressuspendidas em 1 mL de diclorometano, derivatizadas e analisadas em CG-EM. Como forma de avaliar o branco, seguiram-se os mesmos procedimentos, porém utilizando somente água destilada. As determinações foram realizadas em triplicata.

5.5. Cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas (CG-EM)

As amostras de água e sedimento do corpo hídrico a montante e a jusante do município que apresentaram presença de atividade estrogênica no ensaio YES foram submetidas à análise de CG-EM com a finalidade de se identificar a presença de micropoluentes desreguladores endócrinos comumente encontrados em amostras ambientais. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Molecular e

Espectrometria de Massas do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto.

5.5.1. Preparo das amostras

Posteriormente à etapa de EFS, os extratos foram secos com $N_{2(g)}$ e ressuspensos em 1 mL (amostras de água) ou 200 μ L (amostras de sedimento) de diclorometano. Uma alíquota de 100 μ L de cada extrato ressuspensado foi adicionada em frasco com *insert* e evaporada em chapa aquecedora (Corning stirrer/hotplate) a 30°C.

Em seguida, procedeu-se com a etapa de derivatização em capela de exaustão. Foram adicionados 75 μ L do derivatizante bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA : 1% TCMS) e 25 μ L de piridina contendo 200 ppb do padrão interno 4-nonilfenol deuterado em cada *insert* seco. Os frascos foram homogeneizados manualmente, fechados e levados à estufa a 80°C por 30 minutos.

Decorrido o tempo de reação, as amostras foram submetidas à análise de CG-EM. As análises foram realizadas utilizando o equipamento GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu®), munido de injetor automático AOC-20i (Shimadzu®) e coluna Rtx – 5MS de 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Restek) e hélio como gás de arraste. A velocidade linear do gás de arraste foi de 45,0 cm/s, modo de injeção *splitless* e temperatura do injetor de 280°C. A rampa de aquecimento iniciou-se a 50°C por 1 min, aumentou até 100°C a 25°C/min e até 300°C a 15°C/min, com a temperatura final mantida por 5 min, resultando em 37,3 min de corrida.

O espectrômetro de massas foi operado sob as seguintes condições: interfase a 280°C, fonte de ionização a 250°C, tempo de corte de solvente de 5 min. Os íons monitorados para cada micropoluinte e para o padrão interno (PI) juntos à relação massa/carga (m/z) para a quantificação e identificação dos desreguladores endócrinos e seus respectivos tempos de retenção, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Relação m/z para a quantificação e para a identificação dos desreguladores endócrinos monitorados por CG-EM

Desregulador endócrino	Tempo de retenção (min)	Relação m/z para quantificação	Relação m/z para identificação
4-Octilfenol (4-OP)	10,612	179	180-278
4-Nonilfenol (4-NP)	11,300	179	292-277
Bisfenol A (BPA)	13,234	357	372-207
Estrona (E1)	15,681	342	257-218
Estradiol (E2)	15,873	416	285-326
Etinilestradiol (EE2)	16,495	425	300-285
Estriol (E3)	16,924	504	311-345
4-Nonilfenol deuterado*	11,290	183	296-281

* Padrão interno

As amostras que apresentaram inibição do crescimento da levedura no ensaio YES foram submetidas ao modo de varredura de íons (*scanning ions*, SCAN). O propósito foi identificar algum outro composto possivelmente responsável pela inibição.

Os micropoluentes contidos nas amostras foram identificados conforme o tempo de retenção e confirmados por comparação aos espectros presentes na biblioteca do *National Institute of Standards and Technology* (NIST *Mass Spectral Library*®, versão 2.0 d), contida no equipamento.

5.6. Genes de resistência a antibióticos

O perfil dos GRA foi acessado pelo sequenciamento *shotgun* do metagenoma extraído das amostras de água e de sedimento.

Anteriormente a esta análise foi realizado um levantamento dos antibióticos mais vendidos nas 15 principais farmácias do centro urbano de Viçosa, MG, a fim de se relacionar esse com os resultados obtidos na análise dos GRA.

5.6.1. Processamento das amostras

Após a coleta todas as amostras de água e sedimento foram refrigeradas a 4°C até seu processamento, que se deu dentro de 24 horas, no LESA.

5.6.1.1. Água

O processamento das amostras de água seguiu o protocolo estabelecido por Staley et al. (2015), com modificações. Cinco litros das amostras de água foram filtrados a vácuo (membrana de 0,22 µm), sendo uma membrana para cada 200 mL de amostra do ponto a montante e uma membrana para cada 100 mL de amostra do ponto a jusante do município. As membranas foram cortadas em pedaços com tesoura, devidamente limpa com álcool, e colocadas em tubos Falcon estéreis com capacidade de 50 mL. Em seguida foram adicionados 20 mL de tampão SET (Tris 20 mM, NaCl 75 mM e EDTA 25 mM) para cada litro de amostra filtrada. Os tubos foram agitados em vortex por cinco segundos, aproximadamente, para o desprendimento das células microbianas e os pedaços de membrana descartados. O sobrenadante foi mantido a -80 °C até extração do DNA.

5.6.1.2. Sedimento

O processamento das amostras de sedimento seguiu o protocolo adaptado de Liles et al. (2008), Couto (2010) e Silva et al. (2010). Dois gramas de sedimento foram suspensos em 10 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) e incubado em *shaker* a 150 rpm e 20°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. Essa etapa de lavagem foi repetida duas vezes.

Em seguida, foram adicionados 2 mL de tampão TE-pirofosfato (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pirofosfato de sódio 50mM, pH 8,0) e as amostras agitadas em vortex com velocidade baixa por 30 minutos. Decorrido o tempo de agitação, adicionou-se 2 mL de tampão CTAB (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 20mM, NaCl 0,15M e brometo de cetil-trimetilamônio 27 mM) e as amostras foram homogeneizadas por 30 segundos em vortex na velocidade máxima. Separou-se o sedimento das células microbianas por centrifugação a 500 g por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi recuperado e armazenado em tubo Falcon estéril. O sedimento foi ressuspensionado em 4 mL de tampão CTAB, homogeneizado e centrifugado novamente nas mesmas condições descritas anteriormente. Repetiu-se essa etapa duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 10.000 g por 30 minutos. O sobrenadante desta centrifugação foi descartado e às células microbianas adicionou-se 500 µL de solução TE (Tris-HCl/EDTA), que foi mantida a -80 °C até extração do DNA.

5.6.2. Extração do DNA

A extração do DNA das amostras de água e sedimento foi realizada no Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Após o descongelamento, as amostras de água foram lavadas duas vezes com 10 mL de tampão SET (Tris 20 mM, NaCl 75 mM e EDTA 25 mM) e o *pellet* ressuspenso em 2 mL de tampão SET. O DNA total da comunidade microbiana foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2010) com modificações.

As células microbianas foram recuperadas por centrifugação de uma alíquota de 4 mL a 13.400 g por 5 minutos. Os *pellets* foram ressuspenso em 600 µL de tampão PBS e homogeneizados. Lisozima ($C_{\text{final}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) foi adicionada à amostra e após homogeneização, incubada a 37 °C por 30 minutos, com agitação manual a cada 10 minutos. A seguir, proteinase K e dodecil sulfato de sódio (SDS), $C_{\text{final}} = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ e $C_{\text{final}} = 2 \%$, respectivamente foram adicionadas nas amostras e incubadas a 60 °C durante 30 minutos, com agitação manual a cada 10 minutos. Os tubos foram submetidos a três ciclos de congelamento-descongelamento, sendo 2 minutos em nitrogênio líquido seguido de 2 minutos a 65 °C. Igual volume de fenol saturado (pH 8,0) foi adicionado aos tubos contendo as amostras, seguido de homogeneização e centrifugação a 13.400 g por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado a 13.400 g por 5 minutos. Transferido o sobrenadante para um novo tubo, foi adicionado 10 % do volume total de NaCl (5 M) e 2 mL de etanol gelado para precipitação do DNA. Após centrifugação a 13.500 g por 5 minutos, o *pellet* foi lavado uma vez com etanol 70 %, seco e suspenso em 25 µL de água ultrapura (Sistema Direct-Q, Millipore).

A extração do DNA das amostras de sedimento do ponto a montante foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2010). Após descongelamento das amostras, foram adicionados 50 µL de lisozima a 100 mg/mL e as amostras incubadas a 37 °C por 30 minutos, agitando-se manualmente de 10 em 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 100 µL de SDS 10%, seguido de nova incubação das amostras a 65 °C por 1 hora, agitando-se manualmente de 10 em 10 minutos. Igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novo tubo, e adicionou-se 10% do volume de NaCl 5M e 1% de isopropanol, homogeneizou-se e centrifugou-se a amostra a 10.000

g por 40 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em água destilada.

A extração das amostras do sedimento a jusante, foi realizada utilizando-se o kit *NucleoSpin Soil* (Macherey-Nagel), seguindo as recomendações do fabricante.

A qualidade dos DNAs extraídos foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a quantificação determinada por microespectrofotometria (NanoDrop® 2000 spectrophotometer-Thermo Scientific).

5.6.3. Sequenciamento

As amostras de DNA total de água e sedimento foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Pesquisa Molecular MRDNA (Shallowater, Texas, EUA).

As bibliotecas foram preparadas usando o kit de preparação de amostra de DNA Nextera (Illumina), seguindo o procedimento do fabricante. A concentração inicial de DNA foi avaliada usando o kit de ensaio *HS dsDNA Qubit*® (Life Technologies). O DNA extraído das amostras do sedimento do ponto a montante coletadas nos meses de abril e de julho foi limpo usando *DNEasy PowerClean Pro Cleanup Kit* (Qiagen). Foram utilizados de 12 a 50 ng de DNA para preparar as bibliotecas. As amostras foram submetidas à fragmentação e adição simultânea de sequências de adaptadores. Após a preparação da biblioteca, a concentração final das mesmas foi medida usando o kit de ensaio *HS dsDNA Qubit* (Life Technologies) e o tamanho médio da biblioteca foi determinado usando o *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando a plataforma *HiSeq* (Illumina).

5.6.4. Análise das sequências

Os dados de sequências foram submetidos à anotação taxonômica e funcional pelo MG-RAST (*Meta Genome Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (<http://metagenomics.anl.gov/>) (MEYER et al., 2008).

O perfil dos GRA das amostras de água e sedimento foi obtido pela plataforma SEED do MG-RAST pertencente ao subsistema Virulência, Doença e Defesa. Foram selecionados os oito genes de resistência a antibióticos mais abundantes com base no número de sequências obtidas no mesmo subsistema. Para o perfil taxonômico das amostras analisadas utilizou-se o banco de dados Silva SSU depositado no MG-RAST.

A representação gráfica *heat map* foi realizada utilizando-se o software R (R Core Team, 2017). Para cada tipo de mecanismo, os cinco microrganismos mais abundantes com GRA, foram plotados no gráfico. Esse gráfico agrupa sequências em função da similaridade, expresso em diferentes intensidades de cores. Cores fortes e fracas representaram maior e menor abundância de microrganismos, respectivamente.

Os dados de sequência obtidos neste trabalho estão disponibilizados ao público na plataforma do MG-RAST (Tabela 12).

Tabela 12 - Número de acesso da biblioteca disponível no MG-RAST

Amostra	Mês de coleta	Montante	Jusante
Água	Abril	mgl 634881	mgl 634887
	Julho	mgl 634884	mgl 634890
Sedimento	Abril	mgl 634893	mgl 634899
	Julho	mgl 634896	mgl 634902

5.7. Ensaios ecotoxicológicos

O cultivo e a manutenção dos organismos-teste e a execução dos ensaios ecotoxicológicos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da UFV – Aquatox, localizado no LESA.

A qualidade dos organismos-teste utilizados nos ensaios foi verificada por meio de testes de sensibilidade realizados no mínimo uma vez por mês nas mesmas condições do ensaio definitivo, utilizando-se NaCl como substância de referência. Os resultados dos testes de sensibilidade foram agrupados em cartas controle, sendo apropriados para o teste os organismos que obtivessem resposta ao ensaio de sensibilidade dentro da faixa de ± 2 vezes o desvio padrão da média histórica dos resultados.

5.7.1. Toxicidade crônica – *Ceriodaphnia dubia*

A toxicidade crônica das amostras de sedimento foi avaliada pelo teste qualitativo de sobrevivência e reprodução do cladóceros *C. dubia*, conforme recomendado na norma NBR 13373 (ABNT, 2017) com adaptações da norma NBR 15470 (ABNT, 2013) e Burton et al. (2003).

O ensaio foi composto por 10 réplicas, cada uma contendo 5 g de sedimento úmido, 20 mL de água de cultivo e um organismo-teste com menos de 24 horas de

idade. O controle negativo foi composto de apenas 20 mL de água de cultivo e um neonato, mantido nas mesmas condições das amostras. O ensaio teve duração de oito dias, sob temperatura de 23°C, fotoperíodo de 12 a 16 horas de luz difusa e fornecimento de alimentação diária da alga verde *R. subcapitata*. Foram realizadas trocas de 15 mL da água de cultivo nos recipientes a cada três dias. A cada renovação do meio, quantificavam-se os adultos sobreviventes e os neonatos, sendo a média de neonatos de cada tratamento comparada estatisticamente à média do controle.

5.7.2. Toxicidade crônica - *Raphidocelis subcapitata*

A toxicidade crônica das amostras de água foi avaliada pelo ensaio qualitativo de inibição do crescimento da alga verde *R. subcapitata*, conforme a norma NBR 12648 (ABNT 2011).

Os ensaios foram realizados em triplicata, com cada réplica composta de 100 mL da amostra e inóculo de alga em fase de crescimento exponencial, preparado previamente, à concentração inicial de aproximadamente 10^5 células/mL, em *erlenmeyer* estéril. Todas as manipulações foram realizadas em capela de fluxo laminar para evitar contaminação das culturas algáceas. Os frascos *erlenmeyer* foram distribuídos ao acaso em mesa agitadora, alternados diariamente para minimizar possíveis interferências de luminosidade e temperatura, mantidos sob agitação (100-175 rpm) e iluminação (4000 lux) contínuas a 23°C durante 72 horas. O controle, contendo apenas meio mineral e o inóculo foi mantido nas mesmas condições das amostras. No final do ensaio, foi feita a contagem do número de células/mL de cada replicata em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer.

5.7.3. Análise estatística

Para as análises estatísticas dos resultados dos testes de toxicidade foram utilizados o teste de normalidade de *Shapiro Wilk*, teste F para a homocedasticidade de variância e teste t de *Student* para a comparação das médias. Para as amostras que não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste *Wilcoxon's Rank Sum*. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software R (R Core Team, 2017).

Os resultados dos testes com *C. dubia* foram expressos como efeito agudo (EA), quando observada imobilidade/mortalidade estatisticamente significativa dos organismos nas primeiras 48 horas de exposição; tóxico (T), quando observado efeito na sobrevivência e, ou reprodução durante os oito dias, ou não tóxico (NT). Os resultados

dos testes com *R. subcapitata* foram expressos como tóxico (T), quando observada uma redução significativa no crescimento da alga na amostra comparada ao controle, ou não tóxico (NT).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação da qualidade da água por meio de índices numéricos

6.1.1. Índice de qualidade da água - IQA

Os valores dos parâmetros físicos, químicos e microbiológico utilizados para avaliar o IQA durante o período de monitoramento nas águas do Ribeirão São Bartolomeu a montante e no rio Turvo Sujo a jusante são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores dos parâmetros físicos, químicos e microbiológico avaliados nas amostras de água do Ribeirão São Bartolomeu a montante e Rio Turvo a jusante da área urbana de Viçosa, utilizados no cálculo do IQA

Ponto de coleta	Mês de coleta	Parâmetro								
		OD (mg/L)	<i>E.coli</i> (NMP/100mL)	pH	DBO (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fósforo total (mg/L)	Temperatura (°C)	Turbidez (UNT)	Sólidos totais (mg/L)
Montante	Janeiro	4,3	2,0 x 10 ¹	7,1	NA	0,2 ± 0,1	Nd	23,5	5,3	54,0 ± 19,2
	Fevereiro	4,9	1,5 x 10 ²	7,2	NA	0,8 ± 0,1	0,1 ± 0,0	25,5	4,2	50,3 ± 12,5
	Março	4,4	2,0 x 10 ¹	7,5	< 2	1,8 ± 0,1	Nd	25,1	5,6	47,0 ± 7,8
	Abril	8,2	7,4 x 10 ¹	6,0	< 2	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0	20,2	3,1	53,3 ± 1,5
	Maio	4,8	2,2 x 10 ²	7,5	< 2	0,7 ± 0,1	Nd	17,3	3,8	47,0 ± 3,5
	Junho	2,4	1,9 x 10 ²	7,5	< 2	0,4 ± 0,1	Nd	16,4	2,4	30,7 ± 6,5
	Julho	5,7	2,0 x 10 ¹	7,2	< 2	0,5 ± 0,1	Nd	14,5	1,1	51,0 ± 4,6
	Agosto	7,0	1,0 x 10 ¹	7,5	< 2	0,6 ± 0,2	Nd	18,4	3,1	43,0 ± 0,0
Jusante	Janeiro	Nd	9,8 x 10 ⁵	7,7	NA	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,0	25,6	17	161 ± 28,2
	Fevereiro	1,3	4,6 x 10 ⁶	7,1	NA	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	25,8	8,8	130 ± 43,9
	Março	0,8	7,1 x 10 ⁵	7,2	18 ± 0,6	7,3 ± 0,4	1,3 ± 0,0	26,6	17	176 ± 2,3
	Abril	Nd	6,2 x 10 ⁵	6,1	14 ± 4,0	3,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	22,0	14	140 ± 9,0
	Maio	0,6	4,4 x 10 ⁵	7,3	10 ± 2,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0	20,2	15	133 ± 11,5
	Junho	Nd	3,5 x 10 ⁵	6,8	12 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,0	18,6	12	124 ± 16,2
	Julho	Nd	1,6 x 10 ⁵	6,4	8 ± 0,6	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,0	16,8	24	124 ± 2,1
	Agosto	1,4	1,8 x 10 ⁵	7,0	13 ± 1,0	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	20,1	19	151 ± 6,5

* NA = Não avaliado; ** Nd = Não detectado

A qualidade da água a montante esteve dentro dos padrões estabelecidos para águas de classe 2, cujos usos previstos incluem abastecimento para o consumo humano após o tratamento convencional, proteção das comunidades aquáticas, entre outros, de acordo com a Resolução 357 do CONAMA (BRASIL, 2005). Porém, os valores de OD nos meses de janeiro, fevereiro, março, maio e junho estiveram um pouco abaixo do estabelecido de 5 mg/L, o que pode impactar a sobrevivência de alguns organismos aquáticos.

No ponto a jusante, os parâmetros OD, DBO e *E. coli* não atenderam aos padrões para águas de classe 2. A DBO ficou acima do limite de 5 mg/L variando de 8 a 18 mg/L, o que indica elevado teor de matéria orgânica, decorrente principalmente da contaminação por esgoto não tratado, implicando no consumo de OD pelos microrganismos decompositores. De acordo com a resolução CONAMA 357/05, valores de DBO até 10 mg/L ou acima desse, enquadram os corpos hídricos de água doce nas classes 3 e 4, respectivamente. A resolução destina os usos das águas doces de classe 3 ao abastecimento humano após o tratamento convencional ou avançado, à irrigação, pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais, já as de classe 4 são aplicadas à navegação e harmonia paisagística (BRASIL, 2005). A concentração de *E. coli* ($1,6 \times 10^5$ a $9,8 \times 10^5$ NMP/ 100mL) excedeu o valor máximo estabelecido pela legislação de 1.000 NMP/100 mL (classe 2) e também comprova a poluição do corpo hídrico derivado do lançamento de esgoto sanitário ou dejetos de animais, além de ser um alerta para doenças de veiculação hídrica. Esse resultado permitiu enquadrar o corpo hídrico em águas de classe 4, uma vez que os valores encontrados estiveram acima de 4.000 NMP/100 mL em todos os meses avaliados.

O pH se manteve dentro do padrão estabelecido (6,0 a 9,0) e variou entre 6,0 e 7,7. Os níveis de nitrato, que indicam uma poluição remota dos corpos hídricos, estiveram abaixo do limite da resolução vigente, de 10 mg/L e variaram de 0,1 a 7,3 mg/L. Por outro lado, os teores de fósforo total foram maiores que o limite estabelecido pela resolução de 0,05 mg/L para águas de classe 2 e estiveram entre 0,4 a 1,3 mg/L, o que indica um ambiente propício a eutrofização sendo enquadrada na classe 4, uma vez que excederam o limite de 0,15 mg/L conforme preconizado pela resolução vigente. Os valores da temperatura variaram de acordo com a época do ano em que foi realizada a coleta, sendo, portanto, maiores no verão.

A turbidez e o teor de sólidos foram maiores no ponto localizado a jusante, o que prejudica a passagem de luz na coluna d'água. Porém, não ultrapassaram os valores

estabelecidos pela legislação que retrata turbidez de até 100 UNT e a presença de sólidos totais com limite de 500 mg/L.

O perfil do IQA do Ribeirão São Bartolomeu a montante e Rio Turvo Sujo a jusante de Viçosa estão apresentados na Figura 7.

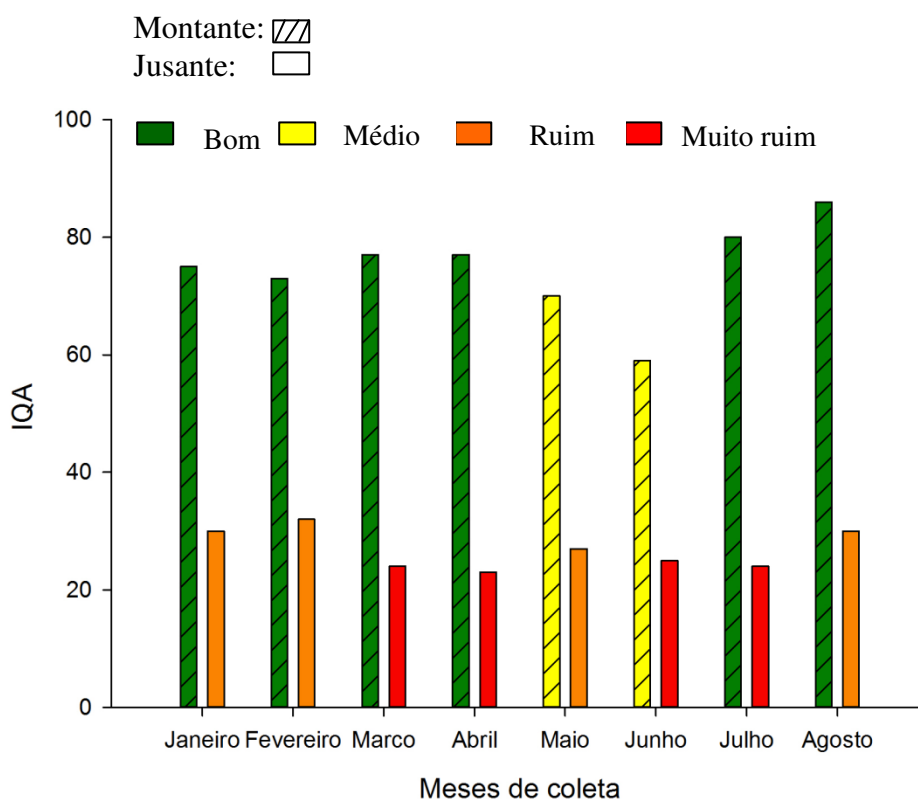


Figura 7 - IQA do Ribeirão São Bartolomeu a montante e Rio Turvo Sujo a jusante do centro urbano de Viçosa, durante o período de monitoramento.

A média do IQA a montante foi de 75 e a jusante 27, o que permitiu classificar a qualidade da água dos corpos hídricos em geral como boa e muito ruim, respectivamente, conforme estabelecido pelo IGAM.

O IQA do ponto a montante nos meses de maio e junho foi apenas médio, o que provavelmente se deve ao aumento dos níveis de *E. coli* e redução do OD. Apesar de não ter excedido o limite máximo estabelecido pela resolução CONAMA 357/05, o aumento de *E. coli* pode ser devido à contaminação fecal por gado, muito comum na região. A redução da vazão do rio que apresentou 0,043 m³/s e 0,032 m³/s nos meses de maio e junho, respectivamente (Figura 3) pode ter influenciado os baixos níveis de OD

devido à escassez de chuva no período estudado, diminuindo a correnteza da água e consequentemente sua oxigenação.

No ponto a jusante, a qualidade da água se mostrou bem inferior, indicando a contaminação do corpo hídrico ocasionada, principalmente, pelo lançamento de esgoto *in natura*, que pode ser considerada a causa da redução da taxa de OD e aumento observado das concentrações de DBO, *E. coli*, sólidos e turbidez. As mesmas variáveis influenciaram negativamente o IQA em um estudo realizado por Nunes et al. (2011) no Rio Turvo Sujo no período de estiagem. Os autores atribuíram a elevada carga orgânica e baixa vazão do rio como as principais causas de deterioração da qualidade da água.

Ramos et al. (2016), quando avaliaram a qualidade da água dos rios Jaguari e Atibaia do estado de São Paulo, verificaram que o rio Atibaia apresentou maior concentração de *E.coli* e DBO. Segundo os autores, esse aumento estava associado a fontes de poluição específicas, uma vez que o rio percorre áreas influenciadas por atividades antrópicas e recebe elevadas cargas de matéria orgânica e inorgânica.

Os valores médios do IQA encontrados a montante e a jusante foram próximos aos encontrados por Prado e Macedo (2016), quando avaliaram a qualidade da água em vários pontos ao longo do Ribeirão São Bartolomeu. Os resultados do IQA obtidos permitiram classificar a qualidade da água como ótima e boa a montante e péssima a jusante, comprovando a influência do lançamento de esgoto sobre a qualidade da água no município de Viçosa.

A diferença significativa entre os valores médios de IQA dos pontos a montante e a jusante ($p < 0,05$) mostra que a contaminação do corpo hídrico ocasionada principalmente pelo lançamento de esgoto *in natura* teve impacto negativo na qualidade da água, que ficou fora dos limites estabelecidos pela resolução brasileira para sua classe de enquadramento após passar pela área urbana de Viçosa. Essa contaminação pode interferir na qualidade da água do Rio Turvo Limpo, afluente do Rio Turvo Sujo, que servirá de suprimento para a captação de água para o abastecimento público de regiões vizinhas.

6.1.2. Índice de qualidade da água para a proteção da vida aquática - IVA

A Figura 8 mostra o perfil do IET para as amostras coletadas a montante e a jusante da área urbana de Viçosa. Os resultados utilizados nos cálculos do IET e IPMCA para avaliar o IVA são apresentados no Apêndice A (Tabela A1 e Tabela A2).

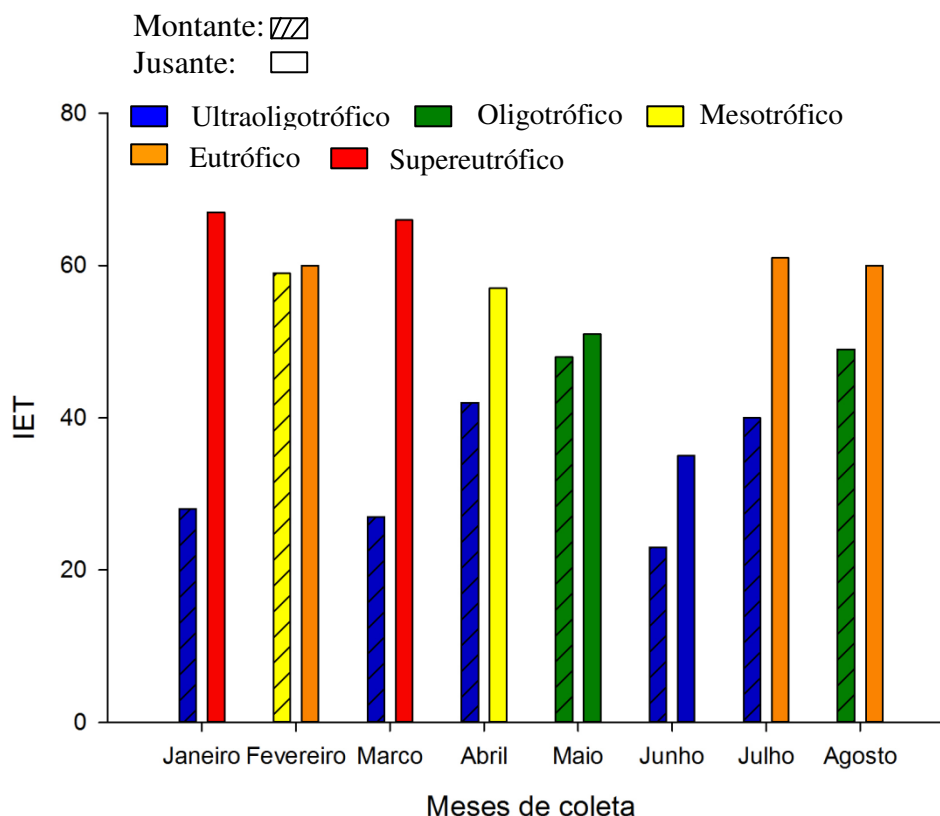


Figura 8 - IET obtidos do ponto a montante e a jusante durante o período de monitoramento.

A qualidade da água no ponto de coleta a montante apresentou baixo grau de trofia, com valores de IET variando entre 23 e 59 $\mu\text{g/L}$, o que possibilitou classificar o corpo hídrico como ultraoligotrófico a mesotrófico. O corpo hídrico não foi afetado por concentrações significativas de nutrientes durante o tempo de estudo, não implicando no crescimento excessivo de algas e consequentemente na ocorrência de eutrofização.

Por outro lado, no ponto a jusante, o grau de trofia predominante foi ultraoligotrófico a supereutrófico, com valores de IET variando de 35 a 67 $\mu\text{g/L}$. Esse aumento pode ter resultado do enriquecimento de nutrientes ocasionado, principalmente, pelo lançamento de esgoto *in natura* no corpo hídrico, que contribui

para o processo de eutrofização. Os estados tróficos oligotrófico e ultraoligotrófico observado nos meses de maio e junho, respectivamente, pode ser consequência das baixas temperaturas e redução da disponibilidade luminosa decorrente do aumento da turbidez na água, interferindo no crescimento de organismos planctônicos, confirmado pelo baixo valor e até mesmo ausência de clorofila *a* nesses meses (Apêndice A, Tabela A1). Além disso, variações na vazão do curso d' água podem interferir na dinâmica da comunidade fitoplanctônica devido a diferença na carga de nutrientes disponível no ambiente aquático, como verificado no estudo realizado por Deus et al. (2013), o que também pode ter influenciado nos graus de trofia encontrados.

No estudo realizado por Bucci et al. (2015), o nível de estado trófico prevalente foi o mesotrófico quando avaliaram um reservatório urbano para abastecimento. Os autores alegaram que a contribuição de descargas de águas residuárias das residências foi a responsável pelo estado trófico encontrado.

O outro índice utilizado para avaliar o IVA, o IPMCA, levou em consideração as variáveis essenciais para a biota aquática além da concentração de compostos tóxicos e os efeitos (toxicidade) provocados aos organismos aquáticos (CETESB, 2010). Os valores das variáveis usadas no cômputo do IPMCA (OD, pH, toxicidade e surfactantes) estão apresentados na Tabela 14. As demais variáveis pertencentes ao grupo de substâncias tóxicas (metais pesados) estiveram abaixo do limite de detecção (Apêndice A, Tabela A2).

Tabela 14 - Variáveis essenciais e substância tóxica que compõem o IPMCA

Ponto de coleta	Mês de coleta	Parâmetros			
		OD (mg/L)	pH	Toxicidade	Surfactantes (mg/L)
Montante	Janeiro	4,3	7,1	NT	NA
	Fevereiro	4,9	7,2	T	NA
	Março	4,4	7,5	T	NA
	Abril	8,2	6,0	T	-
	Maio	4,8	7,5	T	-
	Junho	2,4	7,5	NT	-
	Julho	5,7	7,2	T	-
	Agosto	7,0	7,5	T	-
Jusante	Janeiro	0,0	7,7	T	NA
	Fevereiro	1,3	7,1	NT	NA
	Março	0,8	7,2	NT	NA
	Abril	0,0	6,1	NT	0,4
	Maio	0,6	7,3	NT	1,0
	Junho	0,0	6,8	NT	0,8
	Julho	0,0	6,4	NT	2,1
	Agosto	1,4	7,0	T	1,8

T = Tóxico

NT = Não tóxico

NA = Não avaliado

(-) = Abaixo do limite de detecção (0,1 a 0,4 mg/L)

No ponto de coleta a montante, exceto nos meses de abril, julho e agosto, os valores de OD estiveram abaixo do preconizado pela Resolução CONAMA 357 que estabelece no mínimo 5 mg/L de O₂ para o enquadramento em águas de classe 2 (BRASIL, 2005). Já no ponto a jusante foi encontrado valores muito baixos, inclusive ausência de OD, que resulta da elevada presença de carga orgânica verificado pelo aumento dos níveis de DBO (Tabela 13). Isso levou ao consumo do OD como consequência da respiração bacteriana para estabilizar a matéria orgânica impossibilitando a manutenção de organismos aquáticos aeróbios.

O pH não variou muito, mantendo-se próximo da neutralidade em ambos os pontos de amostragem e dentro do estabelecido pela legislação brasileira CONAMA 357/05 de 6 a 9.

Toxicidade crônica foi detectada na maioria das amostras a montante durante o período estudado. No entanto, no ponto a jusante a toxicidade foi observada apenas nos meses de janeiro e agosto.

Os valores de surfactantes detectados no ponto a jusante variaram de 0,8 a 2,1 mg/L, sendo suficientes para prejudicar o metabolismo de peixes e impedir o desenvolvimento de algumas espécies (DUARTE-DOS-SANTOS et al., 2016).

Considerando as variáveis utilizadas no cálculo do IPMCA e as ponderações estabelecidas de acordo com os níveis de qualidade da água (Anexo A – Tabela A1), foi possível classificar o IPMCA como péssimo em todos os meses de coleta.

A presença de toxicidade a montante provavelmente foi responsável pela classificação péssima do IPMCA nesse ponto. Compostos tóxicos possivelmente podem estar sendo utilizados em plantações na região, o que pode ter contribuído com a detecção da toxicidade e, conseqüentemente, influenciado o índice.

No ponto a jusante, o lançamento de esgoto *in natura* no corpo hídrico é considerado o principal fator determinante do resultado péssimo do IPMCA, indicado pelos baixos valores de OD e presença de surfactantes.

Na Figura 9 são apresentados os resultados do IVA obtidos a partir dos valores do IET e IPMCA.

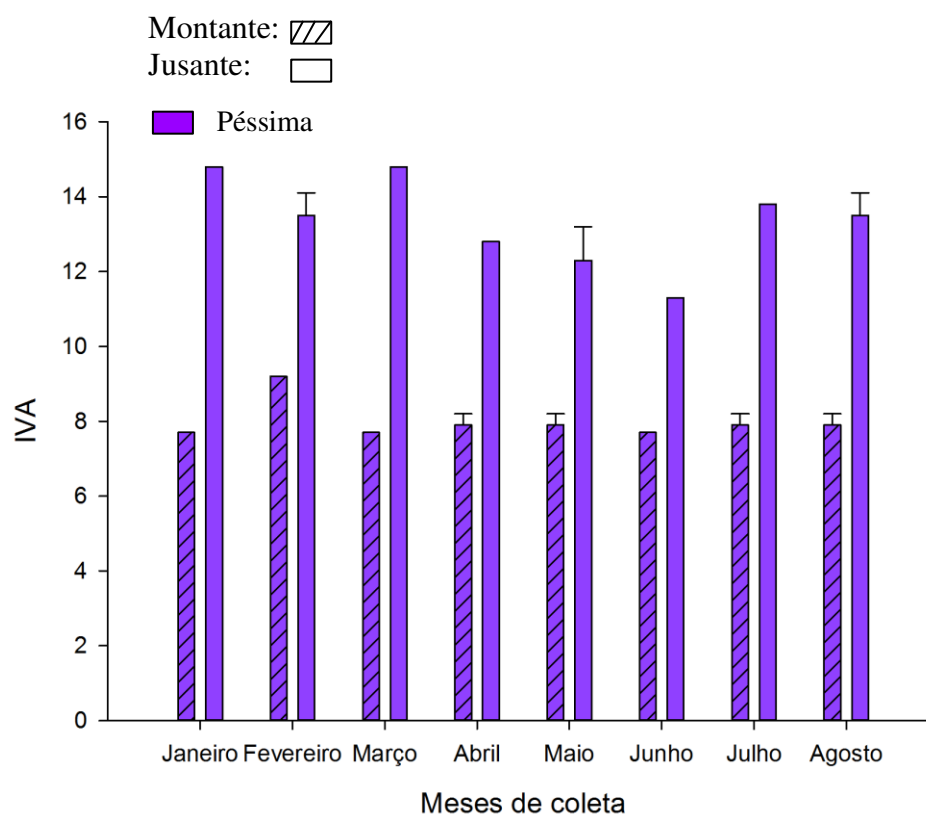


Figura 9 - IVA obtido dos pontos a montante e a jusante durante o período de monitoramento.

O valor médio do IVA a montante (7,9) foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que a jusante da cidade (13,4). No entanto, a qualidade da água de ambos os pontos foi péssima ($IVA > 6,8$, CETESB, 2010), durante todo o período de estudo. O perfil do IVA indica que a qualidade da água, tanto a montante quanto a jusante da cidade, é insatisfatória para a proteção da vida aquática.

Os baixos valores de OD observados nas amostras coletadas a montante da cidade em alguns meses podem ser atribuídos à baixa concentração de nutrientes que pode ter resultado em baixa densidade de organismos fitoplanctônicos no curso d'água, uma vez que a redução da comunidade fitoplanctônica diminui a atividade fotossintética e, conseqüentemente, reduz a oxigenação do ambiente (DUARTE-DOS-SANTOS et al., 2016). Isso foi corroborado pela baixa concentração de clorofila *a* (Apêndice A, Tabela A1) e pelo grau de trofia verificado a montante (Figura 8), permitindo classificar o corpo hídrico como ultraoligotrófico na maioria das amostras analisadas. Outro motivo poderia ser a baixa turbulência da água decorrente da vazão reduzida durante o monitoramento do corpo hídrico.

A toxicidade detectada no curso d'água a montante da cidade pode ter sido causada por alguma fonte de contaminação não identificada nesse estudo. Dessa forma, mais estudos são necessários para investigar a origem da péssima qualidade da água para a proteção da vida aquática verificada a montante do centro urbano do município.

No ponto a jusante, a elevada concentração de matéria orgânica proveniente do lançamento de esgoto *in natura* no corpo hídrico receptor aumentou a concentração de nutrientes, desencadeando o fenômeno de eutrofização, comprovado pelo IET, que acusou um ambiente supereutrófico (Figura 8). A ausência de OD e a presença de surfactantes constatados pelo IPMCA também afetaram o IVA.

6.2. Atividade estrogênica

6.2.1. Ensaio *in vitro* YES

A curva dose-resposta para o controle-positivo 17- β -estradiol compreendeu uma faixa de 2724 ng/L a 1,3 ng/L com limite de detecção de 0,026 ng/L para as amostras de água e 0,013 ng/g para as amostras de sedimento, com CE₅₀ média obtida durante os ensaios de 35 ng/L (Figura 10).

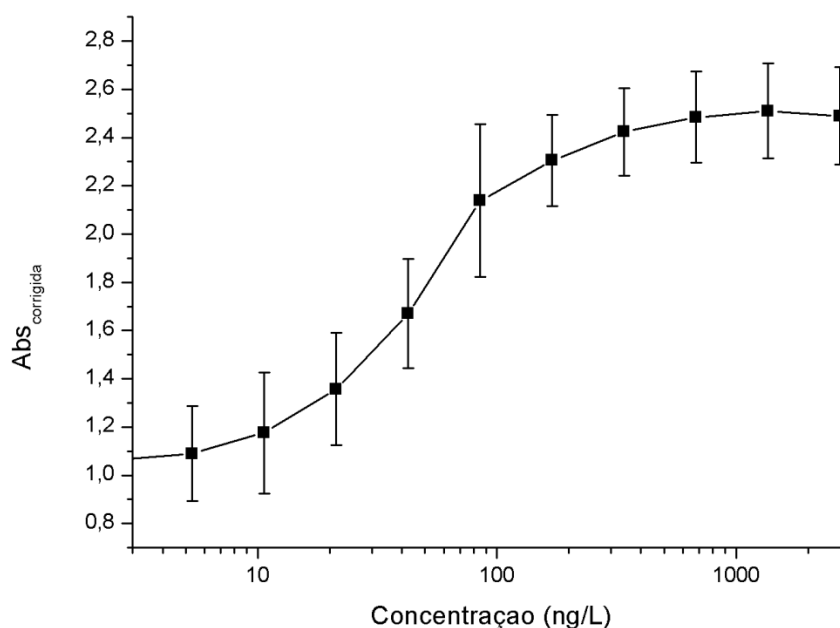


Figura 10 - Curva dose-resposta padrão com a média das absorbâncias corrigidas em função da concentração log para o controle-positivo 17- β -estradiol.

A Figura 11 mostra a atividade estrogênica nas amostras de água ao longo dos oito meses de monitoramento nos dois pontos de amostragem.

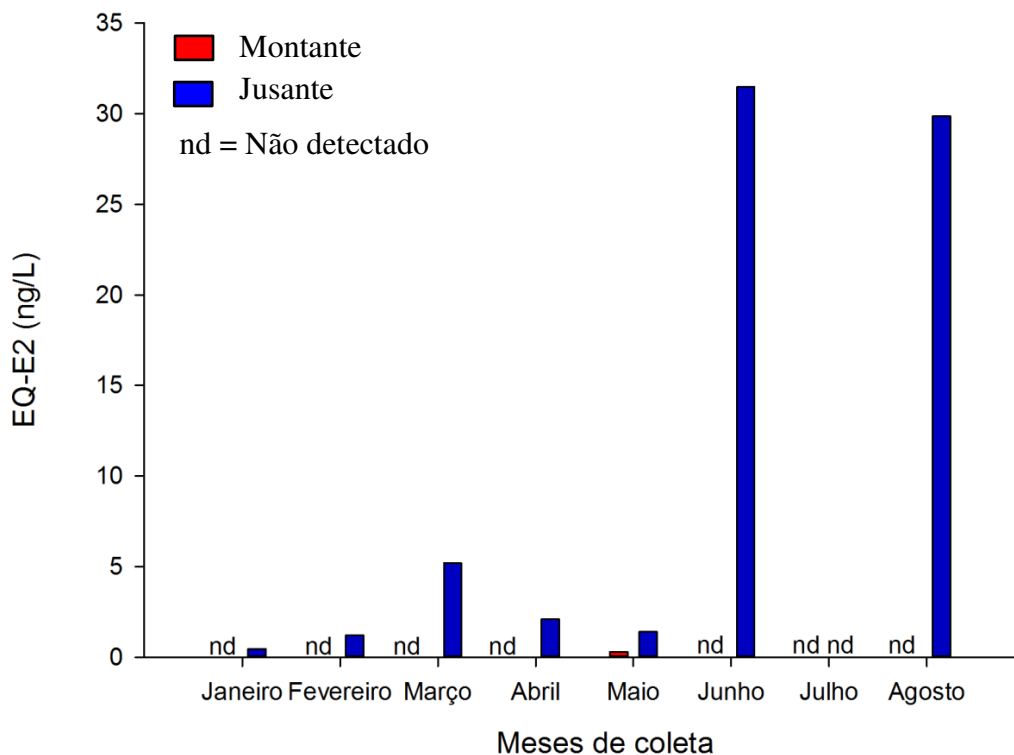


Figura 11 - Concentração da atividade estrogênica em equivalentes de 17- β -estradiol (EQ-E₂) em ng/L nas amostras de água a montante e a jusante do município de Viçosa-MG.

No ponto a montante, foi constatada a atividade estrogênica somente no mês de maio, a uma concentração de 0,28 ng/L EQ-E₂. Esse resultado implica a contribuição de alguma fonte poluidora no corpo hídrico avaliado e a presença de gado pode ser uma das fontes contribuintes, uma vez que a criação de gado é muito comum na região e os dejetos desses animais contêm compostos estrogênicos, conforme constatado por Tashiro et al. (2003).

No ponto a jusante, foi detectada estrogenicidade em todas as amostras de água analisadas, exceto no mês de julho. As concentrações variaram de 0,46 ng/L EQ-E₂ (janeiro) a 31,5 ng/L EQ-E₂ (junho). Dias et al. (2015) também avaliaram a presença de estrogenicidade em amostras de águas superficiais utilizando o ensaio YES e encontraram valores variando de 0,5 a 3,1 ng/L EQ-E₂, bastante inferiores ao maior valor encontrado neste estudo.

Wang et al. (2011) compararam a atividade estrogênica em águas superficiais em períodos de seca e chuva e verificaram atividade estrogênica em praticamente todas as amostras analisadas no período de estiagem, que variaram de 0,26 a 78,8 ng/L EQ-

E₂. Por outro lado, no período chuvoso a maioria das amostras apresentaram resultado abaixo do limite de detecção e a maior concentração encontrada foi de 17,52 ng/L EQ-E₂.

O período de seca também pode ter influenciado no aumento da atividade estrogênica encontrada nas amostras coletadas a jusante da área urbana no presente estudo, como consequência da baixa diluição dos compostos estrogênicos. No entanto, no mês de julho a estrogenicidade esteve abaixo do limite de detecção com 0,018 ng/L de EQ-E₂ o que impossibilitou a sua determinação.

Muitos trabalhos têm abordado a variação sazonal como uma resposta a concentração de estrogenicidade em amostras ambientais. A comparação entre inverno e verão também vêm sendo bastante investigada e estudos apontam a estação mais fria como a mais propensa a desencadear o aumento da atividade estrogênica em águas superficiais. De acordo com Zhang et al. (2014), elevadas temperaturas potencializam os processos de biodegradação e fotodegradação de compostos estrogênicos. No inverno, com a redução da temperatura, a degradação se torna mais lenta (XU et al., 2006). Além da variação da temperatura, outros fatores tais como diluição, adsorção, volatilização, entre outros também devem ser considerados, uma vez que podem acarretar a degradação ou persistência dos contaminantes emergentes no ambiente (MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009). A redução da temperatura observada no inverno associada a algum outro fator citado anteriormente poderia ser um dos motivos que possivelmente explicaria o aumento da concentração de estrogenicidade encontrada nas amostras correspondentes aos meses de junho e agosto no ponto de amostragem a jusante. Além disso, a não detecção de atividade estrogênica no mês de julho poderia ser decorrente da diluição dos micropoluentes ao longo do tempo de exposição no ambiente, que pode ter sido ocasionada pelo aumento da vazão no corpo hídrico a jusante comparado a montante (Figura 4).

Durante o período de incubação do ensaio YES, foi observada a inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae* em grande parte das amostras analisadas (Tabela 15). Essa inibição ocorre devido à presença de compostos tóxicos na amostra e é verificada pela ausência de turbidez geralmente presente nos primeiros poços da placa de ensaio, ou seja, nas menores diluições (Figura 12).

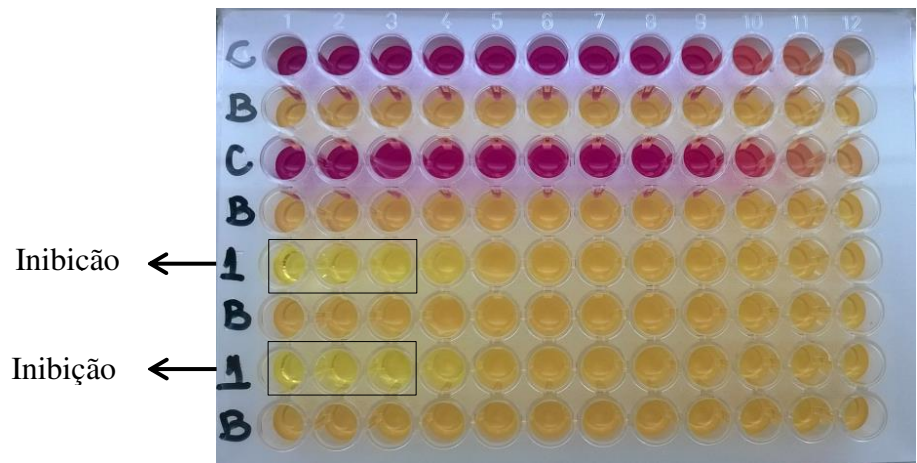


Figura 12 - Placa de ensaio do YES com inibição no crescimento da levedura *S. cerevisiae* (ausência de turvação nos poços) após incubação.

Tabela 15 - Porcentagem de inibição do crescimento da levedura durante o ensaio YES nas amostras de sedimento a montante e a jusante da área urbana do município Viçosa

Ponto de coleta	Amostra	Mês de coleta	Concentração da amostra (%)											
			100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	
Montante	Sedimento	Janeiro	34	52	19									
		Fevereiro	33	24	40	29								
		Maio	84	85	87	88	89							
		Junho	75	77	81	14	8	7	5	6	7	1	2	
		Julho	82	90	90	42	6	3						
		Agosto	80	84	6	37								
		Jusante	Sedimento	Janeiro	50	54	52	43	49	43	17	11	9	13
Março	86			83	71	53								
Abril	79			79	83	84	67							
Maio	75			20										
Junho	79			79	83	89								
Julho	86			82	78	86	46							
Agosto	86			87	88	89	91	93						

Efeito inibitório do crescimento da levedura foi observado em praticamente todas as amostras de sedimento de ambos os pontos de amostragem, exceto nos meses de março e abril a montante e fevereiro a jusante, que não apresentaram estrogenicidade.

Bistan et al. (2012) também verificaram inibição no crescimento da levedura *S. cerevisiae* em amostras de águas residuárias quando avaliaram diferentes métodos de otimização do ensaio YES. Os autores observaram efeito inibitório de, no mínimo 50% em algumas amostras, o que impediu determinar a atividade estrogênica.

Beck et al. (2006), em seu trabalho também conferiram a presença de inibição da levedura após a execução do ensaio YES, o que de acordo com os pesquisadores impossibilitou aferir resultado positivo em amostras com concentrações mais elevadas.

De acordo com Frische et al. (2009), efeitos inibitórios podem conduzir a resultados falsos, uma vez que compostos tóxicos em elevadas concentrações nas amostras reduzem ou até mesmo impedem a detecção de estrogenicidade. Uma alternativa para minimizar os efeitos provocados pela toxicidade é realizar a diluição dos extratos das amostras a serem utilizadas nos ensaios, fazendo com que haja detecção da atividade estrogênica e redução de resultados falsos negativos (BECK; BRUHN; GANDRASS, 2006). Diluições seriais foram realizadas durante a execução do ensaio YES, ainda assim foi possível observar efeitos inibitórios na maioria das amostras de sedimento de ambos os pontos de amostragem, o que pode ter camuflado a presença de estrogenicidade impossibilitando realizar a sua quantificação.

Substâncias que poderiam ser responsáveis pela toxicidade das amostras durante o ensaio YES e seus respectivos espectros de massa são apresentados no Apêndice B. No entanto, mais estudos são necessários para melhor determinar as substâncias que inibem o crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

6.2.2. Eficiência do método de EFS

A porcentagem de recuperação do 17- β -estradiol de uma solução de 10 ng/L após a EFS e quantificação por CG-EM foi de $101,6 \pm 0,4\%$. A metodologia aplicada se mostrou eficiente na recuperação do micropoluinte, sendo adequado para quantificar a presença de 17- β -estradiol em amostras ambientais a concentrações traço.

6.2.3.1. Identificação de desreguladores endócrinos

As amostras de água que apresentaram resultado positivo para a atividade estrogênica no ensaio YES foram submetidas à análise cromatográfica para identificar a presença dos micropoluentes de interesse (4-NP, 4-OP, E1, E2, EE2, E3 e BPA). Os resultados qualitativos são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Identificação dos micropoluentes por CG-EM nas amostras que apresentaram resultado positivo para a estrogenicidade no ensaio YES

Ponto de coleta	Amostra	Mês de coleta	4-OP	4-NP	BPA	E1	E2	EE2	E3
Montante	Água	Maio	-	-	-	-	-	x	-
		Janeiro	-	-	-	-	-	-	-
		Fevereiro	-	-	-	-	-	-	-
Jusante	Água	Março	x	-	x	-	-	-	-
		Abril	-	-	x	-	-	-	-
		Maio	-	x	-	-	-	-	-
		Junho	-	-	x	-	x	-	-
		Julho	x	-	x	-	x	-	-
		Agosto	-	-	-	-	x	-	-
Limite de detecção-(3x sinal/ruído)			0,5	0,7	0,2	0,2	0,7	0,6	1

(-) = Não detectado

(x) = Presença

Foi detectada a presença de EE2 na amostra correspondente ao mês de maio do ponto a montante. O hormônio sintético EE2, frequentemente encontrado em corpos hídricos que recebem esgoto sanitário, é utilizado, principalmente, em pílulas contraceptivas, mas também pode ser usado para otimizar o crescimento de peixes do mesmo sexo e no tratamento de distúrbios reprodutivos e ovulação de gado (ZUO; ZHANG; ZHOU, 2013; ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014). A criação de gado, muito comum na região localizada a montante da cidade, poderia ser um dos motivos para explicar a presença do hormônio no curso d'água.

Outro motivo poderia ser a resistência do EE2 à biodegradação. Essa resistência foi comprovada em um estudo realizado por Jürgens et al. (2002) que compararam a ação de microrganismos na transformação de E2 e EE2 e a meia vida desses compostos. Encontraram que E2 foi transformado a E1 com meia vida de até 9 dias, no entanto a meia vida do EE2 foi de 17 dias sendo, portanto, mais resistente. Além disso, nesse

mesmo estudo, os autores observaram elevada taxa de biodegradação a temperaturas mais altas, o que também pode ter sido um dos fatores para evidenciar a presença do hormônio no corpo hídrico, já que no mês de maio a temperatura a montante foi de 17,3 °C (Tabela 13) o que pode ter reduzido a taxa de biodegradação, contribuindo para o aumento da persistência do hormônio no ambiente.

No ponto a jusante foram detectados os micropoluentes E2, 4-NP, 4-OP e BPA em todos os meses de coleta, exceto janeiro e fevereiro. Os hormônios E1, EE2 e E3 não foram detectados. BPA, 4-OP e 4-NP são frequentemente encontrados em ambientes aquáticos, uma vez que são muito utilizados em processos industriais (YING et al., 2009). O BPA atua como intermediário na produção de resinas e polímeros, o 4-NP e 4-OP resultam da degradação de alquilfenóis polietoxilados, usados como surfactantes não iônicos, antioxidantes, na formulação de pesticidas, entre outros usos (LI et al., 2007; ASIMAKOPOULOS; THOMAIDIS; KOUPPARIS, 2012). O hormônio natural E2 é eliminado diariamente por humanos e animais por meio de urina e fezes, portanto muito comum em esgotos domésticos (BILA; DEZOTTI, 2007).

O ensaio YES fornece a atividade estrogênica geral das amostras e devido a sua elevada sensibilidade, muitos trabalhos têm utilizado o bioensaio como forma de determinar a estrogenicidade de amostras ambientais, juntamente com as análises cromatográficas. Porém, alguns estudos apontam que a presença de compostos antagonistas poderiam inibir a atividade estrogênica durante o ensaio, e atribuem maior detecção dos compostos à análise cromatográfica (WANG et al., 2011; RAO et al., 2013).

Embora a atividade estrogênica tenha sido detectada em praticamente todas as amostras do ponto a jusante pelo ensaio YES, os compostos desreguladores endócrinos avaliados foram identificados em apenas algumas das amostras analisadas. Ying et al. (2009) apontam que esses compostos podem ser diluídos abaixo de seus limites de detecção nos corpos hídricos, o que pode ter acontecido no ponto a jusante do município, onde a vazão foi maior comparado a montante. Wang et al. (2012), que investigaram a ocorrência de 4-OP, 4-NP, BPA, E1, E2 e triclosan em corpo hídrico impactado por descarga de efluente observaram baixa concentração dos micropoluentes no verão, período chuvoso, e também atribuíram a diluição como um dos fatores responsáveis pela baixa detecção dos compostos. Além disso, o bioensaio possivelmente detectou a presença de outros compostos estrogênicos nas amostras que não foram os compostos considerados de interesse nesse estudo, o que também

explicaria a atividade estrogênica na maioria das amostras a jusante comparado à análise cromatográfica.

Por outro lado, nesse estudo também foi possível verificar que o resultado do bioensaio YES no ponto a montante correspondente ao mês de maio foi consistente ao da análise cromatográfica. Isso mostra que tanto a análise química como o bioensaio podem ser usados como ferramenta na identificação e detecção de compostos estrogênicos em corpos hídricos.

6.3. Genes de resistência a antibióticos

O perfil taxonômico das amostras mostrou predominância do domínio *Bacteria*, com médias de 92,9% a 99,2% das sequências nas amostras de água e sedimento, respectivamente. Os percentuais de *Eucarya*, *Archaea* e vírus foram muito baixos, representando menos de 9% das sequências considerando todas as amostras.

Um total de 16 filós de bactéria foram identificados nas amostras de água e sedimento (Figura 13).

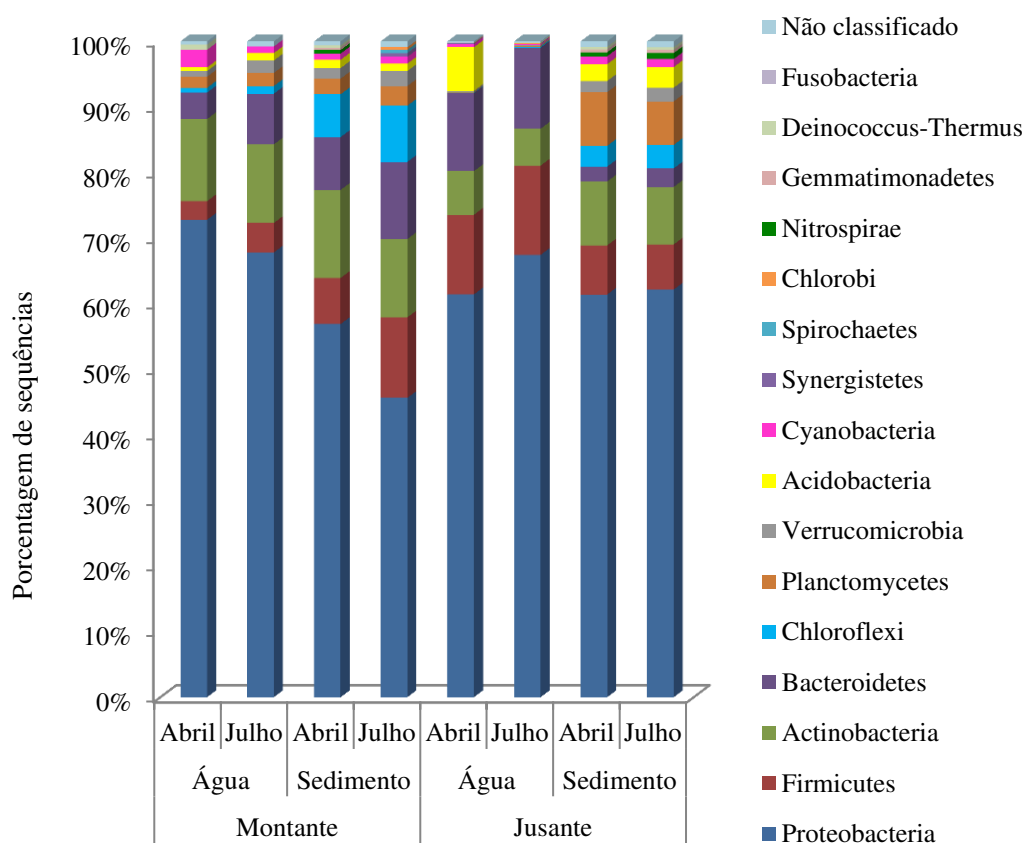


Figura 13 - Abundância relativa dos filos de bactéria presentes nas amostras de água e sedimento dos pontos a montante e a jusante do município de Viçosa.

O filo Proteobacteria foi o predominante, representando mais que 40% do total da comunidade microbiana em todas as amostras analisadas.

O filo Actinobacteria foi o segundo mais abundante nas amostras de água a montante com 12% para ambos os meses de coleta, enquanto que a jusante destacaram-se os filos Firmicutes com 12 e 14% nos meses de abril e julho, respectivamente e Bacteroidetes com 12% para ambos os meses.

No sedimento a montante, o filo Actinobacteria foi o mais abundante no mês de abril (13%), enquanto Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes foram encontrados nas mesmas proporções no mês de julho (11%). No sedimento a jusante, Actinobacteria foi o segundo filo mais abundante nos dois meses de coleta e apresentaram 10% em abril e 9% em julho. Os filos Firmicutes e Bacteroidetes são abundantes na microbiota humana e a abundância desses filos implica que o corpo hídrico avaliado sofre influência decorrente da contaminação fecal, proveniente do descarte de esgoto (MARATHE et al., 2012; KORAJKIC et al., 2015; HUANG et al., 2018).

As amostras de água do ponto a montante apresentaram maior composição microbiana do que as amostras a jusante. Ibekwe et al. (2016) ressaltaram que a adaptação de algumas espécies a ambientes poluídos pode levar ao enriquecimento de comunidades microbianas específicas, o que poderia explicar a menor riqueza observada no ponto a jusante. No entanto, essa diferença não foi observada nas amostras de sedimento, que apresentou composição microbiana similar em ambos os pontos de amostragem. Tal resultado poderia ser explicado devido o sedimento ser um ambiente menos dinâmico quando comparado a água e conseqüentemente flutuações nas características da qualidade da água poderiam afetar mais facilmente os microrganismos dispostos na coluna d'água quando comparado ao sedimento por esse ser um ambiente menos resiliente. Além disso, de acordo com Wang et al. (2016) a concentração de nutrientes, variação sazonal e vazão são alguns dos fatores que podem influenciar na comunidade bacteriana e possivelmente podem ter contribuído na composição microbiana das amostras de água e sedimento antes e após o centro urbano do município de Viçosa.

A composição da comunidade microbiana foi similar à encontrada no estudo realizado por Wang et al. (2018) quando avaliaram amostras de água e sedimento de um rio impactado pela urbanização e por uma usina hidrelétrica. Os pesquisadores utilizaram PCR quantitativo e destacaram a dominância do filo Proteobacteria seguido pelos filios Cyanobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Acidobacteria em 88,9% das seqüências bacterianas nas amostras analisadas.

Os filios Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria também foram dominantes em efluente hospitalar e em águas subterrâneas ao longo de uma área urbana contaminados por antibióticos (SZEKERES et al., 2017; SZEKERES et al., 2018). Segundo Hu et al. (2016), Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria são os principais filios responsáveis pela transferência de genes de resistência a antibióticos, o que pode contribuir com a presença de GRA em amostras ambientais.

6.3.1. Abundância de genes de resistência a antibióticos

Os resistomas das amostras de água e sedimento coletadas a montante e a jusante do centro urbano do município de Viçosa nos meses de abril e julho foram acessados por sequenciamento massivo do DNA metagenômico (Apêndice C, Tabela C1).

Após a anotação das sequências com base no subsistema do banco SEED do MG-RAST foi verificado um perfil funcional diverso para todas as amostras analisadas (Apêndice D). Entretanto, como o objetivo deste trabalho foi explorar a diversidade dos GRA, dentre as categorias funcionais verificadas pela plataforma SEED, analisou-se somente a categoria de Doença, Virulência e Defesa.

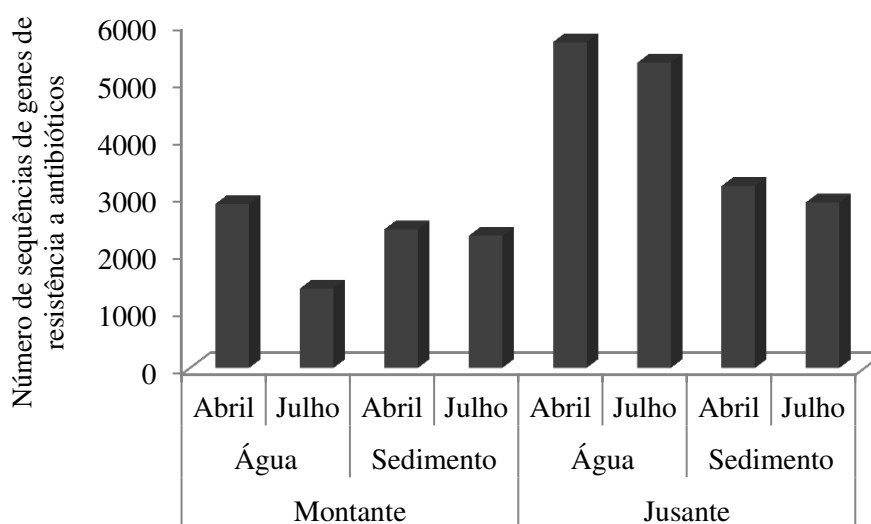


Figura 14 - Número de sequências de genes de resistência a antibióticos nas amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa coletadas nos meses de abril e julho de 2017.

Um total de 26.000 sequências foram identificadas como GRA nas oito amostras analisadas (Figura 14). Houve diferença no número de GRA observados nas amostras de água dos pontos a montante, com 11 e 5% nos meses de abril e julho, respectivamente, e 22 e 20%, correspondentes aos mesmos meses, nas amostras a jusante. O aumento do número de genes a jusante pode ser atribuído ao lançamento de esgoto *in natura*, que contribuiu para a distribuição ou presença de antibióticos no corpo hídrico receptor, alterando a qualidade da água e, conseqüentemente a composição da comunidade microbiana (ZHOU et al., 2017).

Ouyang et al. (2015) também observaram que a presença de esgoto no corpo hídrico conferiu aumento de GRA em um rio na zona urbana e, segundo os autores, a abundância de GRA se deve à pressão de seleção que os antibióticos exercem juntamente com outros compostos químicos no curso d' água.

Nas amostras de sedimento, observou-se menor diferença entre o número de GRA em relação às amostras de água entre os pontos a montante e a jusante e entre os meses de abril e julho. No ponto a jusante, verificou-se 12 % dos genes no mês de abril e 11% no mês de julho e no ponto a montante observou-se aproximadamente a mesma proporção (9%) nos dois meses de coleta.

Uma possível explicação para os maiores números de GRA observados nas amostras de sedimento a montante poderia ser a criação de aves e pecuária desenvolvida na região, uma vez que os antibióticos são comumente utilizados no combate e controle de infecções e como promotores de crescimento animal. Outro motivo que possivelmente explicaria essa diferença seriam os tipos de sedimentos encontrados, posto que a montante o sedimento apresentou-se mais argiloso, o que poderia facilitar a absorção de GRA, diferentemente das amostras de sedimento a jusante, que se mostraram mais arenosos.

Além disso, percebe-se que nos meses de coleta em ambos os pontos de amostragem, a abundância de genes que conferem resistência a antibióticos foi maior nas amostras coletadas em abril, estação quente, comparado às coletadas em julho, estação fria. Essa diferença também foi observada no estudo realizado por Zheng et al. (2018) ao longo de uma bacia hidrográfica, onde verificaram maior concentração de GRA no verão comparado ao inverno, sugerindo que elevadas temperaturas potencializam o aumento de GRA no ambiente como consequência do aumento da atividade microbiana.

6.3.2. Mecanismos de resistência a antibióticos presente nas amostras ambientais

Mecanismos de resistência e genes de resistência a antibióticos foram verificados em todas as amostras de água e sedimento de ambos os pontos de amostragem (Figura 15).

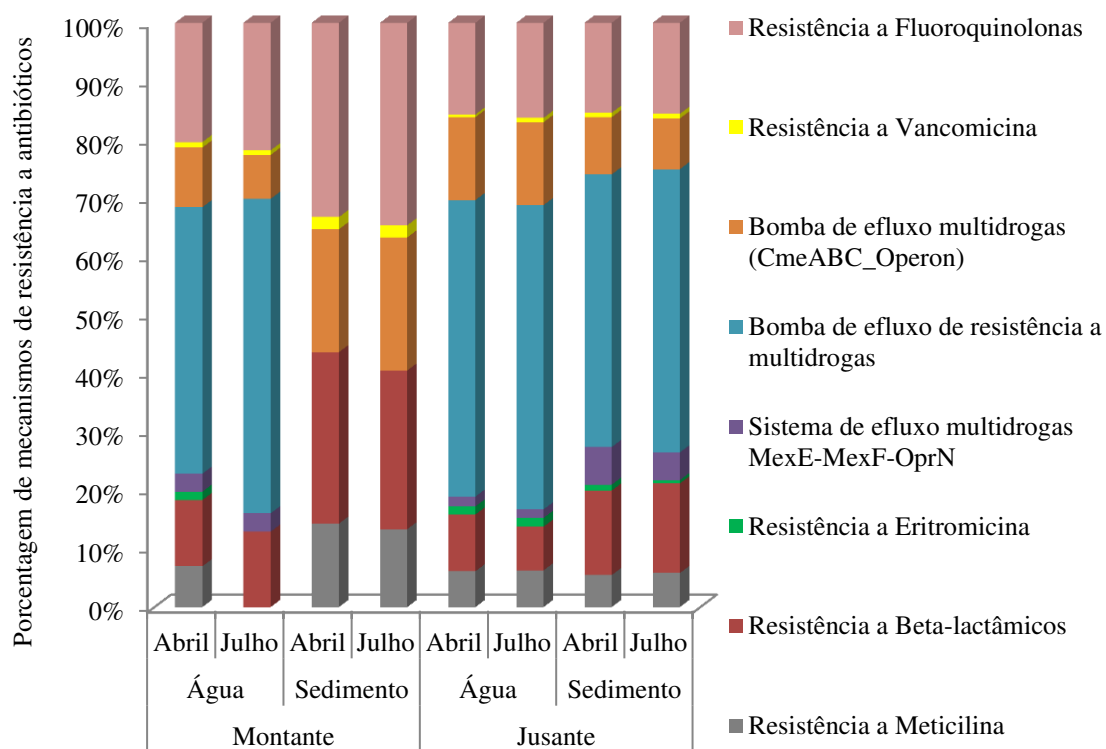


Figura 15 - Porcentagem dos genes de mecanismos de resistência a antibióticos encontrados nas amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa.

O mecanismo de resistência a antibiótico mais abundantemente verificado nas amostras de água, tanto a montante quanto a jusante (42 a 50% dos genes de resistência), bem como nas amostras de sedimento a jusante (44 a 45% dos genes de resistência) foi a bomba de efluxo de resistência a multidrogas, entretanto nas amostras de sedimento a montante esse mecanismo não foi observado nos meses de coleta.

As bombas de efluxo de resistência a multidrogas constituem mecanismos de resistência a uma ampla diversidade de antibióticos e são encontradas no genoma de alguns microrganismos (BLANCO et al., 2016). Yilmaz e Özcengiz (2017) citam β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, cloranfenicol e polimixinas como exemplo das principais classes de antibióticos contra os quais as bactérias podem se tornar resistentes via o mecanismo da bomba de efluxo. Essa resistência é adquirida devido à presença de vários genes de resistência a antibióticos no mesmo elemento genético móvel capaz de conferir resistência a múltiplos antibióticos e que pode ser transmitida por meio da transferência horizontal de genes (MARTINEZ, 2009).

O mecanismo da bomba de efluxo de resistência a multidrogas, codificado pelos genes presentes no operon CmeABC, apresentou uma proporção similar nas amostras de água e sedimento, a montante (7 a 9%) e a jusante (13 a 14%). Este mecanismo confere resistência a sais biliares do trato intestinal e a antimicrobianos presentes no hospedeiro e exerce grande importância na resistência a antibióticos em *Campylobacter jejuni*, uma bactéria comensal que vive no trato gastrointestinal de aves e mamíferos (BOLTON, 2015; VIEIRA et al., 2017). A criação de aves, bovinos e suínos é bastante comum na região estudada e os dejetos provenientes desses animais, juntamente com o lançamento de esgoto, possivelmente podem ter contribuído com a presença de microrganismos contendo esses genes de resistência no corpo hídrico receptor avaliado. Rowe et al. (2016) utilizando o sequenciamento RNAr 16S, também observaram grande contaminação por genes de resistência a antibióticos decorrente do efluente de fazenda de gado na Inglaterra.

Os antibióticos macrolídeos (eritromicina) e quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) são os mais utilizados no tratamento contra a campilobacteriose (OHISHI et al., 2017). Esses medicamentos, quando utilizados em elevadas quantidades, podem conduzir à disseminação de genes de resistência em comunidades bacterianas naturais e, inclusive, proporcionar danos à saúde humana em consequência do consumo de frango (PÉREZ-BOTO et al., 2015).

Genes de resistência a fluoroquinolonas também foram verificados em todas as amostras de água (19 a 20% a montante e 16 a 17% a jusante) e sedimento (29 a 32% a montante e 14 a 15% a jusante). As fluoroquinolonas são muito utilizadas no tratamento de infecções bacterianas em humanos e outros animais. Apresentam como principal mecanismo de ação a inibição da síntese de DNA, atuando nas enzimas DNA girase em bactérias gram-negativas e na topoisomerase IV em bactérias gram-positivas (ADACHI et al., 2013). O exagerado consumo dessa classe de antibióticos contribui para sua permanência no ambiente, uma vez que até 70% da dose ingerida é excretada de forma não metabolizada e os compostos apresentam elevada capacidade de adsorção no ambiente e baixa biodegradabilidade, o que poderia explicar a abundância de genes de resistência a fluoroquinolonas nas amostras analisadas (VAN DOORSLAER et al., 2014).

Genes que conferem resistência a β -lactâmicos foram encontrados em maior proporção a montante (10 a 12% na água e 25 a 26% no sedimento) comparado a jusante (7 a 9% na água e 14% no sedimento). A resistência aos β -lactâmicos pode ser conferida pela produção da enzima β -lactamase, capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico e

impedir a síntese da parede celular bacteriana, sendo este o mecanismo mais eficiente em bactérias gram-negativas (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). A presença de β -lactâmicos verificada em ambas as amostras e pontos de amostragem implica no consumo de medicamentos a base desse princípio ativo, uma vez que são muito utilizados no tratamento de doenças bacterianas em humanos, assim como suplementação alimentar e crescimento animal (CHA; YANG; CARLSON, 2006; CHENG et al., 2018).

Sabri et al. (2018) constataram a presença de genes de resistência a sulfonamida, tetraciclina e macrolídeos por meio da análise de PCR quantitativo em amostras de água e sedimento a jusante de uma estação de tratamento de esgoto na Holanda. No entanto, não houve diferença entre os genes identificados antes e após o lançamento do efluente e nos tipos de amostra. Os pesquisadores alegaram que a estação de tratamento não é a única fonte de antibióticos no corpo hídrico e que o escoamento de fezes de animais de pastagem ou selvagens pode ter contribuído para a contaminação.

Verificou-se na Figura 15 que as proporções de genes que conferem resistência a antibióticos não diferiram numericamente entre as amostras de água e sedimento coletadas a montante e a jusante do centro urbano do município de Viçosa em abril e julho. Percebe-se que os GRA podem estar presentes em diversas matrizes ambientais decorrente do lançamento de esgoto *in natura* e inclusive de fezes de animais, como o gado. Tal fato é consequência do elevado consumo desses medicamentos e da baixa absorção do composto pelo organismo. Assim, o lançamento de esgoto *in natura* no corpo hídrico receptor a jusante do centro urbano de Viçosa juntamente com outras fontes poluidoras a montante do município são importantes contribuintes para a disseminação de GRA na bacia hidrográfica estudada.

De acordo com a pesquisa realizada nas principais farmácias do município estudado, os antibióticos pertencentes às classes β -lactâmicos e fluoroquinolonas são os mais consumidos pela população (Tabela 17). Esses resultados estão em conformidade com os genes de resistência encontrados em maior abundância nesse estudo (Figura 15).

Tabela 17 - Antibióticos mais vendidos nas principais farmácias de Viçosa e suas respectivas classes durante o período de janeiro a agosto de 2017

Antibiótico	Classe
Cefalexina	β-lactâmicos
Amoxicilina	
Amoxicilina + Clavulanato de potássio	
Cefaclor	
Ceftriaxona	
Norfloxacino	Fluoroquinolonas
Levofloxacino	
Ciprofloxacino	
Cloridrato de ciprofloxacino	
Azitromicina	Macrolídeos
Claritromicina	

6.3.3. Análise taxonômica dos genes de resistência a antibióticos

A contaminação dos corpos hídricos por antibióticos, além de alterar a comunidade microbiana, pode desencadear o desenvolvimento de genes de resistência (XU et al., 2015). Das amostras estudadas, foram selecionadas para análise taxonômica as cinco espécies bacterianas mais abundantes encontradas para os diferentes genes de resistência a antibióticos (Figura 16).

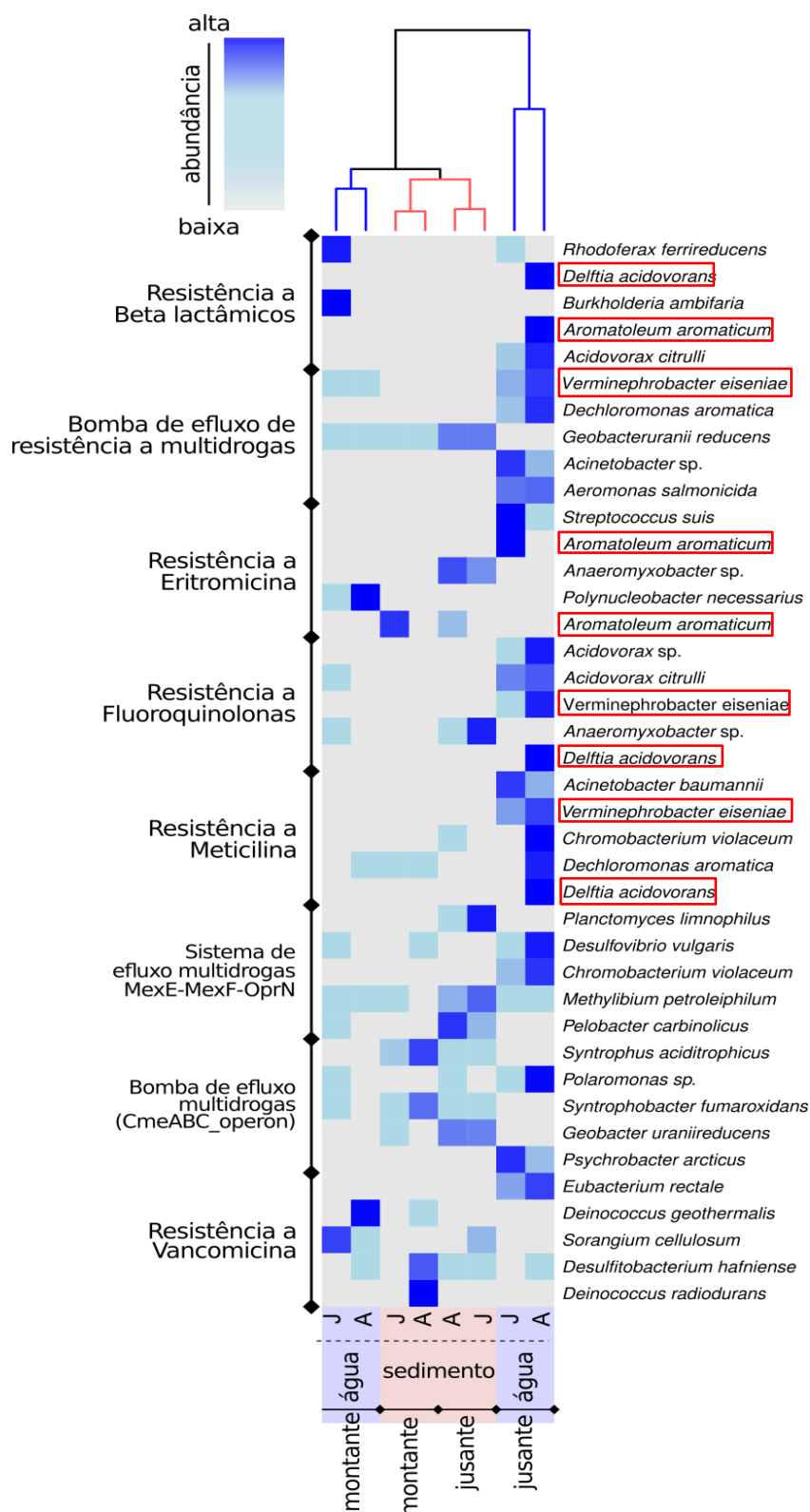


Figura 16 - Heat map com abundância de bactérias que contém genes de resistência a antibióticos presentes nas amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa. A cor cinza indica que não foi detectada bactéria com genes de resistência a antibióticos nas amostras. A = Abril e J = Julho. Destacado em vermelho: bactérias contendo genes de resistência a mais de um tipo de antibiótico.

De acordo com o agrupamento observado no *heat map*, as amostras de água no ponto a montante e as amostras de sedimento a montante e jusante se mostraram semelhantes entre si, porém diferiram das amostras de água do ponto a jusante.

Maior abundância de bactérias com genes de resistência foi verificado nas amostras de água e sedimento coletadas a jusante da cidade nos meses de abril e julho. Esse aumento sugere que o lançamento de esgoto contribuiu de forma significativa para a presença de organismos com genes de resistência ao longo do curso d' água, como observado no trabalho de Tang et al. (2016).

Como verificado no perfil taxonômico de todas as sequências (Figura 13), o filo Proteobacteria foi o mais abundante entre as sequências dos GRA. Entretanto, a composição de espécies da comunidade bacteriana aos quais os GRA foram afiliados foi bastante heterogênea entre os tipos de amostras e pontos de amostragem analisados. Nas amostras de água a montante, os genes de resistência a β -lactâmicos foram afiliados às espécies de bactéria *Rhodospirillum rubrum* e *Burkholderia ambifaria*, sendo mais abundantes no mês de julho. Nas amostras de água a jusante, a maioria das sequências dos GRA foram afiliadas às espécies *Delftia acidovorans*, *Aromatoleum aromaticum* e *Verminiphrobacter eiseniae*, as quais foram representadas por genes que conferem resistência a diferentes antibióticos com maior abundância no mês de abril (Figura 16).

As amostras de sedimento a montante mostraram-se mais abundantes as sequências afiliadas às bactérias *Desulfotobacterium hafniense* e *Deinococcus radiodurans*, com genes resistentes à vancomicina no mês de abril. A jusante, em ambos os meses de coleta, as sequências mais abundantes corresponderam as espécies bacterianas *Geobacteruranii reducens*, que apresentaram genes de resistência a bomba de efluxo multidrogas e ao operon CmeABC, e as sequências afiliadas a *Anaeromyxobacter* sp. cujos genes de resistência foram a eritromicina e fluoroquinolonas.

Vaz-Moreira et al. (2014) citam alguns exemplos dos gêneros hospedeiros de genes de resistência a antibióticos comumente encontrados em ambientes aquáticos, os quais se destacam *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*.

O gênero *Burkholderia*, também encontrado nas amostras de água a montante nesse estudo, é de bactérias gram-negativas que possuem uma barreira de penetração externa a membrana que impede a entrada do antimicrobiano, tornando-as resistentes e dificultando o tratamento de infecções por elas provocadas (RHODES; SCHWEIZER, 2016). Os indivíduos pertencentes à espécie *Burkholderia cepacia* são considerados um

dos principais patógenos responsáveis por infecções do trato respiratório em pacientes com fibrose cística (CIPOLLA et al., 2017). Jiang et al. (2018) também verificaram por abordagem metagenômica bactérias que contêm GRA em amostras de águas superficiais e sedimento de um corpo hídrico na China de uma região intensamente urbanizada. Os resultados indicaram maior concentração de GRA nas amostras de água em relação ao sedimento, com abundância do gênero *Burkholderia*.

Das cepas de bactérias isoladas de um rio contaminado com esgoto, Garcia-Armisen et al. (2011) identificaram pelo sequenciamento RNAr 16S, 32 microrganismos com GRA. Dentre os isolados, foi possível constatar a presença de *Delftia acidovorans*, com genes de resistência a cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, aztreonam e tetraciclina. Essa espécie de bactéria, também detectada nas amostras de água a jusante do centro urbano de Viçosa, é considerada um agente oportunista a diversos tipos de infecções, podendo ocorrer por meio de diferentes fontes de contaminação as quais incluem os cursos d'água e equipamentos utilizados em hospitais (CAMARGO et al., 2014).

Bactérias com genes que conferem resistência a antibióticos em águas e sedimentos de rios têm sido amplamente investigadas. Devido ao descarte contínuo de antibióticos, comunidades bacterianas são capazes de exercer uma pressão seletiva ao longo do tempo e, conseqüentemente, propagar genes de resistência no meio aquático (PROIA et al., 2018).

Novo et al. (2013) alegam que a disseminação de genes de resistência a antibióticos pode ser consequência das condições ambientais. Esses pesquisadores constataram que a temperatura e a presença de matéria orgânica na água influenciam a diversidade de populações bacterianas resistentes a antibióticos, devido aos nutrientes contidos nos esgotos, que podem intervir no crescimento e na dinâmica de algumas espécies bacterianas. As contribuições decorrentes do lançamento de esgoto *in natura*, do tratamento de infecções animais e descarte inadequado desses medicamentos podem ser considerados responsáveis pelo aumento da incidência de bactérias com GRA observada nas amostras de água e sedimento após o centro urbano do município de Viçosa.

6.4. Ensaios ecotoxicológicos

A relação entre a toxicidade crônica para os organismos *R. subcapitata* e *C. dubia*, o tipo de amostra (água ou sedimento) e o ponto de amostragem (montante ou jusante) pode ser visualizada na Tabela 18.

Tabela 18 - Toxicidade crônica das amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa

Ponto de coleta	Organismo-teste	Amostra	Mês de coleta							
			Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
Montante	<i>R. subcapitata</i>	Água	NT	T	T	T	T	NT	T	T
	<i>C. dubia</i>	Sedimento	T	T	NT	NT	NT	T	T	T
Jusante	<i>R. subcapitata</i>	Água	T	NT	NT	NT	NT	T	NT	NT
	<i>C. dubia</i>	Sedimento	NT	NT	NT	NT	NT	T	T	T

T = Tóxico

NT = Não tóxico

Foi possível verificar a presença de toxicidade em ambos os pontos de amostragem. Os efeitos de toxicidade crônica foram notados em maior frequência nas amostras de água e sedimento coletadas a montante do centro urbano, quando comparado a jusante. Na região localizada a montante do município estudado são observadas algumas práticas agrícolas que podem empregar o uso de compostos químicos, tais como fertilizantes e defensivos. Dessa forma pode ocorrer a lixiviação desses compostos para o corpo hídrico, o que explicaria a presença de toxicidade detectada nas amostras.

A ausência de toxicidade verificada em alguns meses após o centro urbano do município pode ser atribuída à diluição e/ou degradação dos micropoluentes ao longo do curso d' água, o que pode ter reduzido a sua concentração e conseqüentemente as amostras se mostraram menos tóxicas no ponto de coleta a jusante da cidade.

Toxicidade foi detectada no sedimento em ambos os pontos de amostragem. A persistência de micropoluentes nos sedimentos por longos períodos de tempo pode ser considerada a principal causa da toxicidade em corpos hídricos, uma vez que muitos poluentes podem ficar aderidos aos sedimentos fazendo com que atuem como sumidouro de inúmeros contaminantes tornando-os biodisponíveis à coluna d'água conforme alterações hidrológicas (ZOPPINI et al., 2014; KE et al., 2015).

A toxicidade do sedimento de um rio na Dinamarca que recebe descarga de esgotamento urbano foi avaliada por Christensen et al. (2006) que verificaram efeitos tóxicos nas amostras coletadas. De acordo com os autores, os sedimentos podem contribuir significativamente com a presença de efeitos tóxicos na água devido à suspensão de partículas tóxicas.

A diferença observada nos testes ecotoxicológicos antes e após o núcleo urbano do município de Viçosa, possivelmente pode está atribuída às características dos pontos de amostragem avaliados. No ponto a montante, algum produto tóxico não identificado nesse estudo e possivelmente utilizado na região pode ter sido um dos precursores da toxicidade verificada nas amostras de água. A jusante, apesar do lançamento de esgoto no corpo hídrico, a concentração das substâncias potencialmente tóxicas podem não ter sido suficiente para causar efeitos aos organismos expostos devido à capacidade de diluição dos compostos e conseqüentemente mostraram-se menos tóxicas.

Por outro lado, a detecção da toxicidade nos meses de janeiro e fevereiro a montante do município nas amostras de sedimento pode está atribuída à composição da matéria orgânica presente no sedimento o que pode ter influenciado na toxicidade das amostras.

Muitos estudos apontam o lançamento de esgoto como uma das conseqüências da atividade estrogênica, resistência a antibióticos e danos aos seres vivos ao longo do tempo de exposição em corpos hídricos receptores. No entanto, os testes de toxicidade para os organismos utilizados nesse trabalho, não corroboraram com os resultados constatados pelo ensaio YES, análise cromatográfica e metagenômica utilizados para avaliar os efeitos associados a presença de CPE nas amostras de água e sedimento do corpo hídrico avaliado.

7. CONCLUSÃO

A qualidade da água avaliada pelo IQA foi alterada ao longo da bacia hidrográfica estudada, com classificação boa a montante e muito ruim a jusante do centro urbano, mostrando que a qualidade do corpo hídrico receptor sofre grande influência decorrente do lançamento de esgoto *in natura*. O IVA, embora tenha se mostrado estatisticamente diferente entre os pontos de amostragem, foi classificado como péssimo em ambos os pontos de amostragem, mostrando que a montante do município também há indícios da presença de micropoluentes prejudiciais à vida aquática.

A atividade estrogênica identificada pelo ensaio YES permitiu constatar a existência de compostos desreguladores endócrinos em todos os meses de coleta a jusante do centro urbano. A montante foi detectada estrogenicidade somente no mês maio, implicando que há fontes poluidoras no curso d'água antes da cidade que contribuem à presença desses compostos no corpo hídrico.

No sedimento, as amostras podem não ter apresentado compostos estrogênicos ou a inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae* pode ter mascarado a presença de estrogenicidade nas amostras. Nesse caso, estudos devem ser realizados para esclarecer as causas e os compostos responsáveis pela toxicidade à levedura.

Os micropoluentes E2, 4-NP, 4-OP e BPA foram detectados no ponto a jusante da cidade, sendo BPA o mais frequente. O hormônio sintético EE2 foi identificado na amostra coletada a montante da cidade no mês de maio, indício de contaminação por esgoto doméstico.

Pela análise molecular independente de cultivo, foi possível identificar GRA na água e no sedimento de ambos os pontos de amostragem. A constatação desses compostos permitiu inferir que o corpo hídrico a montante já apresenta indícios de contaminação por antibióticos e que possivelmente pode ser a causa da presença dos GRA encontrados. A jusante, o lançamento de esgoto é considerado o principal responsável pela presença desses contaminantes e contribui com sua persistência e importância de antimicrobianos ao longo do curso d'água.

Os resultados dos testes de toxicidade crônica das amostras de água e sedimento não se correlacionaram com os teores dos micropoluentes verificados pelo bioensaio YES, análise cromatográfica e metagenômica e apresentaram-se mais tóxicos a montante do município estudado.

Os ensaios YES, análise cromatográfica, metagenômica e toxicidade crônica mostraram que o corpo hídrico receptor antes e após o centro urbano do município de Viçosa sofre influências de fontes de poluição por CPE que prejudicam a qualidade da água e oferecem perigos ao ecossistema aquático e à saúde humana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, F. et al. Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 444, p. 508–514, fev. 2013.
- ANNAMALAI, J.; NAMASIVAYAM, V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. **Environment International**, v. 76, p. 78–97, mar. 2015.
- AQUINO, S. F. DE; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n.3, p.187-204, 2013.
- APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for the Examination of Water Wastewater, 21 ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2012.
- ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**, v. 69, p. 104–119, ago. 2014.
- ASIMAKOPOULOS, A. G.; THOMAIDIS, N. S.; KOUPPARIS, M. A. Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. **Toxicology Letters**, v. 210, n. 2, p. 141–154, abr. 2012.
- ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica - Método de ensino com *Ceriodaphnia sp* (Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro, 2017.
- ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15470**: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em sedimento – Método de ensaio com *Hyalella spp* (Amphipoda). Rio de Janeiro, 2013.
- ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*). Rio de Janeiro, 2011.
- BAI, X. et al. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. **Chemosphere**, v. 200, p. 133–142, jun. 2018.
- BECK, I.-C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. **Chemosphere**, v. 63, n. 11, p. 1870–1878, jun. 2006.
- BELL, J. H. et al. **Antibiotic Resistance Genes Detection in Environmental Samples**. [s.l.] CourseSource, 2016.
- BENGTSSON-PALME, J. et al. Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. **Science of The Total Environment**, v. 572, p. 697–712, dez. 2016.

BILA, D. M. Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -estradiol pelo Processo de Ozonização. **Tese de Doutorado** em Ciências em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.

BISTAN, M. et al. Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity in water bodies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 427–433, 2012.

BLANCO, P. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 14, 16 fev. 2016.

BOLTON, D. J. Campylobacter virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99–108, jun. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Governo Federal, Brasília. Publicada no DOU nº 53, de 18 de março de 2005, Seção 1, p. 58 - 63. 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. **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. Diário Oficial da União, 2011.

BUCCI, M. M. H. S.; DELGADO, F. E. DA F.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Water quality and trophic state of a tropical urban reservoir for drinking water supply (Juiz de Fora, Brazil). **Lake and Reservoir Management**, v. 31, n. 2, p. 134–144, 3 abr. 2015.

BURTON, G. A.; DENTON, D. L.; HO, K.; IRELAN, D.S. Sediment Toxicity Testing: Issues and Methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. e CAIRNS, J. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003.

CALERO-CÁCERES, W. et al. The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. **Environmental Pollution**, v. 223, p. 384–394, abr. 2017.

CAMARGO, C. H. et al. Microbiological characterization of Delftia acidovorans clinical isolates from patients in an intensive care unit in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, n. 4, p. 330–333, dez. 2014.

CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7936–7947, maio 2015.

CARLSON, R. E. A trophic state index for lakes. **Limnology and oceanography**, v. 22, n. 2, p. 361–369, 1977.

CARTER, D. L. et al. Antibiotic resistant bacteria are widespread in songbirds across rural and urban environments. **Science of The Total Environment**, v. 627, p. 1234–1241, jun. 2018.

- CARVALHO, I. T.; SANTOS, L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. **Environment International**, v. 94, p. 736–757, set. 2016.
- CETESB - Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. **Variáveis de qualidade da água**. São Paulo, 2010.
- CHA, J. M.; YANG, S.; CARLSON, K. H. Trace determination of β -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, n. 1–2, p. 46–57, maio 2006.
- CHENG, J. et al. Distribution and fate modeling of 4-nonylphenol, 4-t-octylphenol, and bisphenol A in the Yong River of China. **Chemosphere**, v. 195, p. 594–605, mar. 2018.
- CHRISTENSEN, A. M.; NAKAJIMA, F.; BAUN, A. Toxicity of water and sediment in a small urban river (Store Vejleå, Denmark). **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 621–625, nov. 2006.
- COUTO, G. H. Caracterização de uma nova lipase de uma biblioteca metagenômica do solo de mangue do Pontal do Sul. **Tese de Doutorado em Bioquímica**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009
- CIPOLLA, L. et al. Prevalencia de especies del complejo Burkholderia cepacia en pacientes con fibrosis quística en Argentina durante el período 2011-2015. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, out. 2017.
- CRISTALE, J. et al. Priority and emerging flame retardants in rivers: Occurrence in water and sediment, Daphnia magna toxicity and risk assessment. **Environment International**, v. 59, p. 232–243, set. 2013.
- DAN LIU et al. Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: Implications for ecological and human health risks. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 222–229, jun. 2017.
- DE ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1–2, p. 145–153, 2001.
- DE CASTRO-CATALÀ, N. et al. Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 297–306, jan. 2016.
- DESTRIEUX, D. et al. Drug residues in urban water: A database for ecotoxicological risk management. **Science of The Total Environment**, v. 609, p. 927–941, dez. 2017.
- DEUS, R. et al. Three-dimensional model for analysis of spatial and temporal patterns of phytoplankton in Tucuruí reservoir, Pará, Brazil. **Ecological Modelling**, v. 253, p. 28-42, out. 2012.

DIAS, A. C. V. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 41–47, out. 2015.

DOS SANTOS, D. F. K. et al. Functional Metagenomics as a Tool for Identification of New Antibiotic Resistance Genes from Natural Environments. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 2, p. 479–491, fev. 2017.

DUARTE-DOS-SANTOS, A. K. et al. Aquatic life protection index of an urban river Bacanga basin in northern Brazil, São Luís - MA. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 3, p. 602–615, 3 out. 2016.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, 2008.

ESTEBAN, S. et al. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of The Total Environment**, v. 466–467, p. 939–951, jan. 2014.

FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 5, p. 593–603, jul. 2009.

GALASSI, S.; GUZZELLA, L.; CROCE, V. Screening organic micropollutants in surface waters by SPE extraction and ecotoxicological testing. **Chemosphere**, v. 54, n. 11, p. 1619–1624, mar. 2004.

GARCIA-ARMISEN, T. et al. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. **Water Research**, v. 45, n. 2, p. 788–796, jan. 2011.

GONG, J. et al. Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5–12, p. 556–563, 2011.

GOTHWAL, R.; SHASHIDHAR, T. Antibiotic Pollution in the Environment: A Review: Antibiotic Pollution in the Environment. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 43, n. 4, p. 479–489, abr. 2015.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; BARRA CARACCILO, A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25–39, jan. 2018.

WHA-Water Analysis Handbook. Hack Company, 6th Edition, 2011.

HÖGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 11, p. 509–515, nov. 2010.

HU, Y. et al. The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6672–6681, 15 nov. 2016.

HUANG, Q. et al. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. **Animal Nutrition**, out. 2017.

HUANG, X. et al. Shifts in dissolved organic matter and microbial community composition are associated with enhanced removal of fecal pollutants in urban stormwater wetlands. **Water Research**, v. 137, p. 310–323, 15 jun. 2018.

IBEKWE, A. M.; MA, J.; MURINDA, S. E. Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources. **Science of The Total Environment**, v. 566–567, p. 1176–1185, out. 2016.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/>>. Acesso em 20 de novembro de 2017.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2015/default.shtm>>. Acesso em 28 de fevereiro de 2018.

IGAM - INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS. Relatório de monitoramento das águas superficiais na Bacia do Rio Paraíba do Sul em 2003. Belo Horizonte: Projeto Águas de Minas, 2004.

IGAM – INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS-Monitoramento da qualidade das águas. Disponível em: < <http://www.igam.mg.gov.br/monitoramento-da-qualidade-das-aguas2>>. Acesso em 6 de março de 2018.

ISMAIL, N. A. H.; WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. **Chemosphere**, v. 188, p. 375–388, dez. 2017.

JASINSKA, E. J. et al. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. **Science of The Total Environment**, v. 530–531, p. 140–153, out. 2015.

JIANG, H. et al. Exploring the differences of antibiotic resistance genes profiles between river surface water and sediments using metagenomic approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 64–69, out. 2018.

JIANG, J.-Q.; ZHOU, Z.; SHARMA, V. K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water — A review from global views. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 292–300, set. 2013.

JÜRGENS, M. D. et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 480–488, 2002.

KÄLLQVIST, T. et al. Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Water Research**, v. 42, n. 8–9, p. 2146–2156, abr. 2008.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KE, X. et al. Characterization of estrogenic receptor agonists and evaluation of estrogenic activity in the sediments of Liaohe River protected areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, n. 1, p. 176–181, nov. 2015.

- KÖNIG, M. et al. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 1220–1230, jan. 2017.
- KORAJKIC, A. et al. Changes in bacterial and eukaryotic communities during sewage decomposition in Mississippi river water. **Water Research**, v. 69, p. 30–39, fev. 2015.
- KUMAR, A.; PAL, D. Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 52–58, fev. 2018.
- KUZMANOVIĆ, M. et al. Ecotoxicological risk assessment of chemical pollution in four Iberian river basins and its relationship with the aquatic macroinvertebrate community status. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 324–333, jan. 2016.
- LAMPARELLI, M. C. Graus de trofia em corpos d'água do Estado de São Paulo: Avaliação dos métodos de monitoramento. **Tese (Doutorado em Ciências na área de Ecossistemas Terrestres e Aquáticos)** Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- LAUNAY, M. A.; DITTMER, U.; STEINMETZ, H. Organic micropollutants discharged by combined sewer overflows – Characterisation of pollutant sources and stormwater-related processes. **Water Research**, v. 104, p. 82–92, nov. 2016.
- LI, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193–201, abr. 2014.
- LI, X. et al. Distribution patterns of octylphenol and nonylphenol in the aquatic system at Mai Po Marshes Nature Reserve, a subtropical estuarine wetland in Hong Kong. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 6, p. 657–662, 2007.
- LILES, M. R. et al. Recovery, Purification, and Cloning of High-Molecular-Weight DNA from Soil Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 10, p. 3302–3305, 15 maio 2008.
- LIU, R.; ZHOU, J. .; WILDING, A. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1–2, p. 19–26, jun. 2004.
- LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, mar. 2014.
- MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 572, p. 138–146, dez. 2016.
- MADIGAN M. T.; PARKER, J.; MARTINKO, J. M.; BROCK, T. D. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 10^a ed., 608 p. 2004.
- MAIER, D. et al. Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. **Water Research**, v. 72, p. 127–144, abr. 2015.

- MARATHE, N. et al. Changes in human gut flora with age: an Indian familial study. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 222, 2012.
- MARATHE, N. P. et al. Untreated urban waste contaminates Indian river sediments with resistance genes to last resort antibiotics. **Water Research**, v. 124, p. 388–397, nov. 2017.
- MARTI, E.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J. L. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in a River Influenced by a Wastewater Treatment Plant. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e78906, 25 out. 2013.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2893–2902, nov. 2009.
- MEDEIROS, A. C. et al. Quality index of the surface water of Amazonian rivers in industrial areas in Pará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 123, n. 1–2, p. 156–164, out. 2017.
- MEFFE, R.; DE BUSTAMANTE, I. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. **Science of The Total Environment**, v. 481, p. 280–295, maio 2014.
- MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 2008.
- Ministério do Meio Ambiente e Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável Minas Gerais. 2005. Programa Nacional do Meio Ambiente - PNMA II. Cálculo do Sistema de Qualidade da Água (SCQA): estabelecimento das equações do índice de qualidade da água (IQA). Relatório I. 2005
- MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 803–814, jul. 2009.
- MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.
- NOVO, A. et al. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 5, p. 1875–1887, abr. 2013.
- NUNES, D. G.; SILVA, D. D.; MATOS, A. T. Índice de Qualidade da Água em Trechos do Rio Turvo Sujo, Viçosa – MG. **Revista Engenharia na Agricultura - REVENG**, v. 19, n. 5, p. 459–468, 31 out. 2011.
- OHISHI, T. et al. Molecular epidemiological analysis of human- and chicken-derived isolates of *Campylobacter jejuni* in Japan using next-generation sequencing. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 23, n. 3, p. 165–172, mar. 2017.

- OMAR, T. F. T. et al. Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 241–259, dez. 2016.
- OUYANG, W.-Y. et al. Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5697–5707, jul. 2015.
- PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062–6069, nov. 2010.
- PECK, M. et al. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 945–952, 2004.
- PENG, F.-J. et al. Occurrence and ecological risk assessment of emerging organic chemicals in urban rivers: Guangzhou as a case study in China. **Science of The Total Environment**, v. 589, p. 46–55, jul. 2017.
- PÉREZ-BOTO, D. et al. Isolation of a point mutation associated with altered expression of the CmeABC efflux pump in a multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* population of poultry origin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 115–122, jun. 2015.
- PERRY, J. A.; WESTMAN, E. L.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: what's new? **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 45–50, out. 2014.
- PLAHUTA, M. et al. Toxic and endocrine disrupting effects of wastewater treatment plant influents and effluents on a freshwater isopod *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). **Chemosphere**, v. 174, p. 342–353, maio 2017.
- PRADO, E. V.; MACEDO, V. D. M. Determinação do índice de qualidade da água em trechos do Ribeirão São Bartolomeu, município de Viçosa-MG. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 9, p. 948 - 964, nov. 2016.
- PROIA, L. et al. Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. **Science of The Total Environment**, v. 628–629, p. 453–466, jul. 2018.
- QIAO, M. et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment. **Environment International**, v. 110, p. 160–172, jan. 2018.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAMOS, M. A. G. et al. Water Quality Index (WQI) of Jaguari and Atibaia Rivers in the region of Paulínia, São Paulo, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 5, maio 2016.
- RAO, K. et al. Determination of estrogens and estrogenic activities in water from three rivers in Tianjin, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 6, p. 1164–1171, jun. 2013.

- RHODES, K. A.; SCHWEIZER, H. P. Antibiotic resistance in Burkholderia species. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 82–90, set. 2016.
- RODRIGUES, K. L. T. et al. Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 242–249, nov. 2014.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, v. 69, p. 234–242, fev. 2015.
- 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.
- ROWE, W. et al. Comparative metagenomics reveals a diverse range of antimicrobial resistance genes in effluents entering a river catchment. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 7, p. 1541–1549, 7 abr. 2016.
- SABRI, N. A. et al. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, mar. 2018.
- SANDERSON, H. et al. Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant. **Environmental Reviews**, v. 24, n. 2, p. 205–218, jun. 2016.
- SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 45–95, mar. 2010.
- SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 16 jun. 2014.
- SHI, P. et al. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. **Water Research**, v. 47, n. 1, p. 111–120, jan. 2013.
- SIFAKIS, S. et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 56–70, abr. 2017.
- SILVA, C. C. et al. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. **Journal of microbiology and biotechnology**, 2010.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 15 fev. 2011.
- SNIS - Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento. Portal Eletrônico Eletrônico Eletrônico. Brasília: Disponível em <<http://snis.gov.br>>, acessado em outubro de 2016.
- SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 92–98, set. 2010.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1–4, p. 57–67, fev. 2010.

SRIVASTAVA, G.; KUMAR, P. Water quality index with missing parameters. **International Journal of Research in Engineering and Technology**. v.2, n.4, p.609-614, 2013.

STALEY, C. et al. Evaluation of water sampling methodologies for amplicon-based characterization of bacterial community structure. **Journal of Microbiological Methods**, v. 114, p. 43–50, jul. 2015.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492–498, out. 2004.

SUN, J. et al. Endocrine disrupting compounds reduction and water quality improvement in reclaimed municipal wastewater: A field-scale study along Jialu River in North China. **Chemosphere**, v. 157, p. 232–240, ago. 2016.

SZEKERES, E. et al. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 304–315, jun. 2017.

SZEKERES, E. et al. Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. **Environmental Pollution**, v. 236, p. 734–744, maio 2018.

TANENBAUM, D. M. et al. The JCVI standard operating procedure for annotating prokaryotic metagenomic shotgun sequencing data. **Standards in Genomic Sciences**, v. 2, n. 2, p. 229–237, 30 mar. 2010.

TANG, J. et al. Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in a wastewater treatment plant and its receiving surface water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 260–269, out. 2016.

TASHIRO, Y. et al. Livestock wastes as a source of estrogens and their effects on wildlife of Manko tidal flat, Okinawa. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, n. 1–6, p. 143–147, jan. 2003.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 3, p. 2-12, fev. 2012.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia. Porto Alegre: ARTMED, 10^a ed., 934 p. 2012.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis, report N°. EPA/630/R-96/012, Washington D. C., 1997.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 7470A. Mercury in Liquid Waste (Manual Cold-Vapor Technique). Revision 1, 1994.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 6010C. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Revision 3, 2007.

- VÄLITALO, P. et al. Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-review. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 3, p. 558–569, maio 2017.
- VAN DOORSLAER, X. et al. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. **Science of The Total Environment**, v. 500–501, p. 250–269, dez. 2014.
- VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 761–778, jul. 2014.
- VETHAAK, A. .; BELFROID, A.; GRAY, M. **Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands: occurrence, potency and biological effects**. Lelystad; Den Haag: RIZA Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment ; RIKZ Institute for Coastal and Marine Management, 2002.
- VIEIRA, A. et al. CmeABC Multidrug Efflux Pump Contributes to Antibiotic Resistance and Promotes *Campylobacter jejuni* Survival and Multiplication in *Acanthamoeba polyphaga*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 22, p. e01600-17, 15 nov. 2017.
- VIGANÒ, L. Assessment of the toxicity of River Po sediments with *Ceriodaphnia dubia*. **Aquatic toxicology**, v. 47, n. 3–4, p. 191–202, 2000.
- VIGANÒ, L. et al. Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. **Chemosphere**, v. 73, n. 7, p. 1078–1089, out. 2008.
- VILELA, C. L. S.; BASSIN, J. P.; PEIXOTO, R. S. Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 546–559, abr. 2018.
- VON SPERLING, M. V. Estudo e modelagem da qualidade da água de rios. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1ª ed., 588 p. 2007.
- VOS, J. G. et al. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, n. 1, p. 71–133, 2000.
- VRANAKIS, I. et al. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 88–99, jan. 2014.
- WALSH, C. Antibiotics: action, origins, resistance. AMS Press: Washington, 2003.
- WANG, L. et al. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 1, p. 148–156, jan. 2011.
- WANG, L. et al. Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 241–249, jun. 2012.

WANG, P. et al. Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. **Science of The Total Environment**, v. 569-570, p. 382-389, nov, 2016.

WANG, L. et al. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. **Science of The Total Environment**, v. 627, p. 600–612, jun. 2018.

WANG, Q.; WANG, P.; YANG, Q. Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 621, p. 990–999, abr. 2018.

WHA - WATER ANALYSIS HANDBOOK 6th ed. Hack Company, 2011.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 779-788, 2010.

XU, J. et al. Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. **Chemosphere**, v. 65, n. 9, p. 1445–1451, nov. 2006.

XU, J. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. **Chemosphere**, v. 119, p. 1379–1385, jan. 2015.

XU, Y. et al. Occurrence and distribution of antibiotics, antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 833–840, jun. 2016.

YILMAZ, Ç.; ÖZCENGİZ, G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 43–62, jun. 2017.

YING, G.-G. et al. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 18, p. 5147–5155, set. 2009.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa, 1^a ed., 478 p. 2006.

ZHA, D. et al. Occurrence and attenuation of pharmaceuticals and their transformation products in rivers impacted by sewage treatment plants. **RSC Advances**, v. 7, n. 65, p. 40905–40913, 2017.

ZHANG, A.; LI, Y.; CHEN, L. Distribution and seasonal variation of estrogenic endocrine disrupting compounds, N-nitrosodimethylamine, and N-nitrosodimethylamine formation potential in the Huangpu River, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, n. 5, p. 1023–1033, maio 2014.

ZHANG, M. et al. The relative risk and its distribution of endocrine disrupting chemicals, pharmaceuticals and personal care products to freshwater organisms in the Bohai Rim, China. **Science of The Total Environment**, v. 590–591, p. 633–642, jul. 2017.

ZHENG, J. et al. High-throughput profiling of seasonal variations of antibiotic resistance gene transport in a peri-urban river. **Environment International**, v. 114, p. 87–94, maio 2018.

ZHOU, Z.-C. et al. Antibiotic resistance genes in an urban river as impacted by bacterial community and physicochemical parameters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 30, p. 23753–23762, out. 2017.

ZOPPINI, A. et al. Organic priority substances and microbial processes in river sediments subject to contrasting hydrological conditions. **Science of The Total Environment**, v. 484, p. 74–83, jun. 2014.

ZUO, Y.; ZHANG, K.; ZHOU, S. Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, a case study. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 8, p. 1529, 2013.

APÊNDICE

Apêndice A

Tabela A1 – Valores de fósforo total e clorofila *a* utilizados no cálculo do IET para as amostras de água

Ponto de coleta	Mês de coleta	Parâmetro	
		Fósforo total ($\mu\text{g/L}$)	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/L}$)
Montante	Janeiro	$42,0 \pm 10,6$	0,0
	Fevereiro	$58,0 \pm 23,4$	$5,1 \pm 0,2$
	Março	$36,0 \pm 8,5$	0,0
	Abril	$59,0 \pm 2,6$	$0,3 \pm 0,3$
	Maio	$4,3 \pm 5,8$	$2,6 \pm 0,1$
	Junho	0,0	$1,0 \pm 0,1$
	Julho	$27,3 \pm 2,5$	$0,3 \pm 0,3$
	Agosto	$30,3 \pm 5,7$	$0,8 \pm 0,3$
Jusante	Janeiro	$520,0 \pm 24,3$	$9,6 \pm 1,3$
	Fevereiro	$406,3 \pm 35,0$	$2,0 \pm 0,2$
	Março	$1251,3 \pm 31,0$	$3,8 \pm 1,1$
	Abril	$676,3 \pm 38,6$	$0,8 \pm 0,3$
	Maio	$751,0 \pm 26,9$	$0,7 \pm 0,6$
	Junho	$691,7 \pm 14,6$	0,0
	Julho	$670,7 \pm 42,7$	$1,7 \pm 0,2$
	Agosto	$916,0 \pm 58,0$	$1,2 \pm 0,2$

Tabela A2 – Valores dos parâmetros utilizados no cálculo do IPMCA nas amostras de água a montante e a jusante do município de Viçosa

Ponto de coleta	Mês de coleta	Parâmetros										
		OD (mg/L)	pH	Toxicidade	Cádmio (mg/L)	Cromo (mg/L)	Cobre (mg/L)	Chumbo (mg/L)	Mercúrio (µg/L)	Níquel (mg/L)	Zinco (mg/L)	Surfactantes (mg/L)
Montante	Janeiro	4,3	7,1	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	NA
	Fevereiro	4,9	7,2	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	NA
	Março	4,4	7,5	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	NA
	Abril	8,2	6,0	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	-
	Maio	4,8	7,5	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	-
	Junho	2,4	7,5	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	-
	Julho	5,7	7,2	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	-
	Agosto	7,0	7,5	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	-
Jusante	Janeiro	0,0	7,7	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	NA
	Fevereiro	1,3	7,1	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	NA
	Março	0,8	7,2	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	NA
	Abril	0,0	6,1	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	0,4
	Maio	0,6	7,3	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	1,0
	Junho	0,0	6,8	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	0,8
	Julho	0,0	6,4	NT	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	2,1
	Agosto	1,4	7,0	T	<0,010	<0,010	<0,04	<0,010	<1,0	<0,010	<0,01	1,8

T = Tóxico

NT = Não tóxico

NA = Não avaliado

(-) = Abaixo do limite de detecção (0,1 a 0,4 mg/L)

Apêndice B

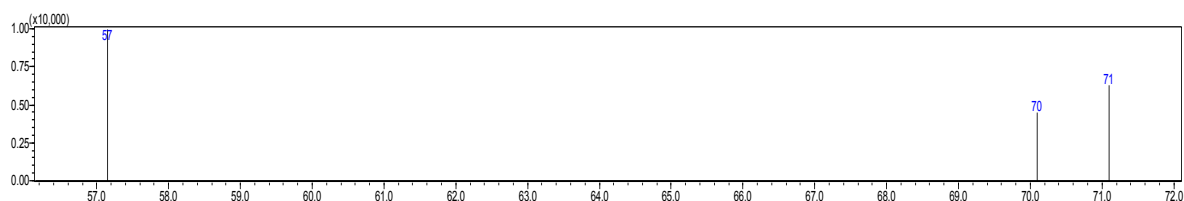
Tabela B1 – Compostos identificados pelo modo SCAN presentes nas amostras de sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa

Ponto de coleta	Amostra	Mês de coleta	Tempo de retenção	% de similaridade	Substância
Montante	Sedimento	Janeiro	12,749	91	Butano
		Fevereiro	13,123	93	Ácido oleico
		Maio	13,164	89	Bis 2-etilhexil maleato
		Junho	14,997	90	Di-n-octilftalato
		Julho	14,997	91	Di-n-octilftalato
		Agosto	15,043	94	Di-n-octilftalato
Jusante	Sedimento	Janeiro	12,057	89	Ácido hexadecanóico
		Fevereiro	10,725	90	Silano
		Março	10,777	96	Ácido tetradecanóico
		Abril	12,1	93	Ácido hexadecanoico
		Maio	14,997	93	Di-n-octilftalato
		Junho	12,979	93	Ácido octadecanóico
		Julho	12,075	85	Ácido hexadecanóico
		Agosto	13,285	93	Ácido octadecanóico

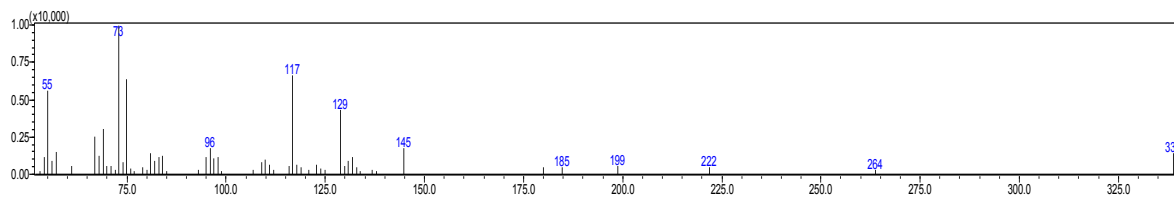
Espectros das substâncias identificadas pelo modo SCAN nas amostras de sedimento

Montante

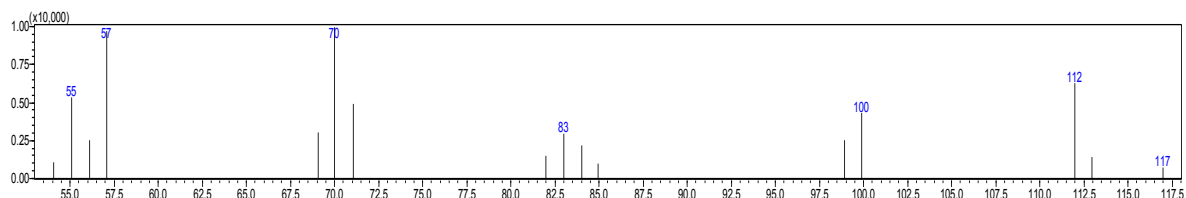
Janeiro - Butano



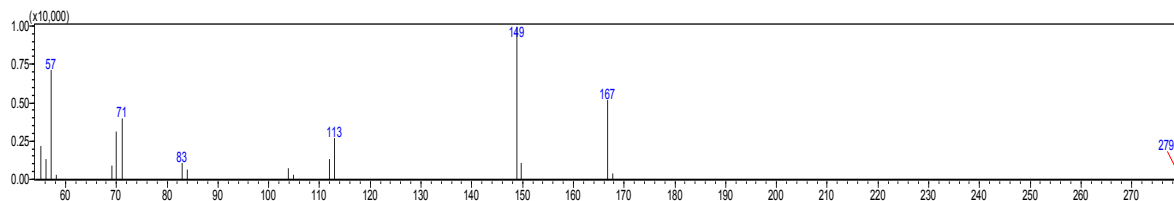
Fevereiro - Ácido oleico



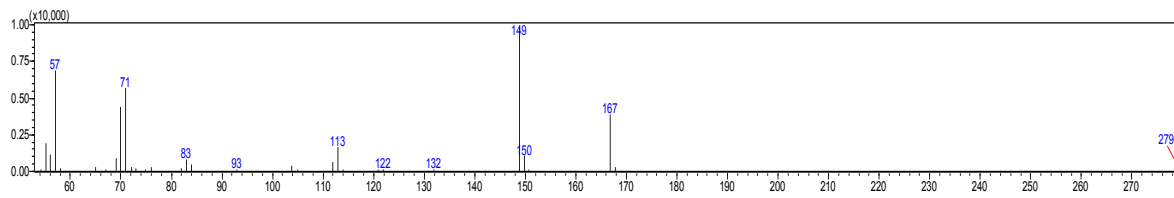
Maior - Bis 2-etilhexil maleato



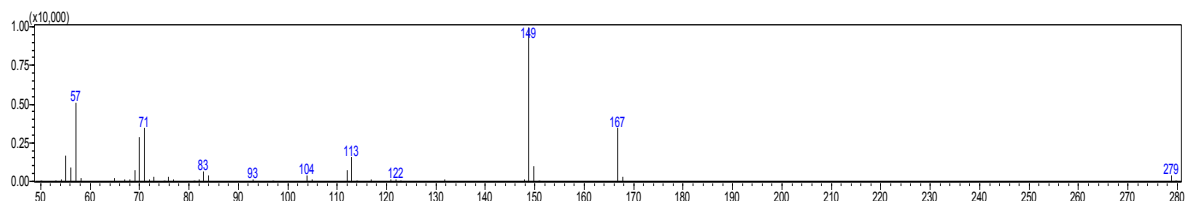
Junho - Di-n-octil ftalato



Julho - Di-n-octil ftalato

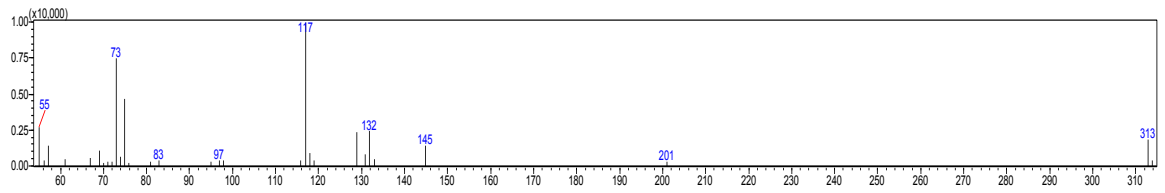


Agosto - Di-n-octil ftalato

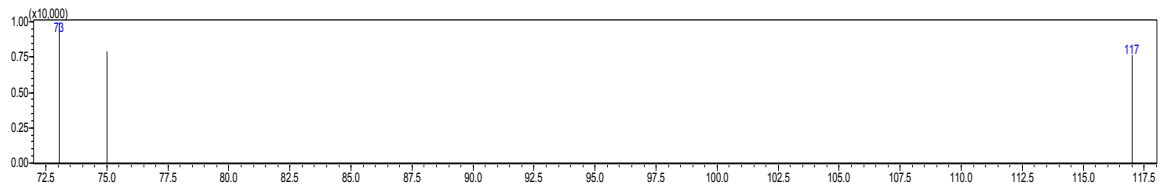


Jusante

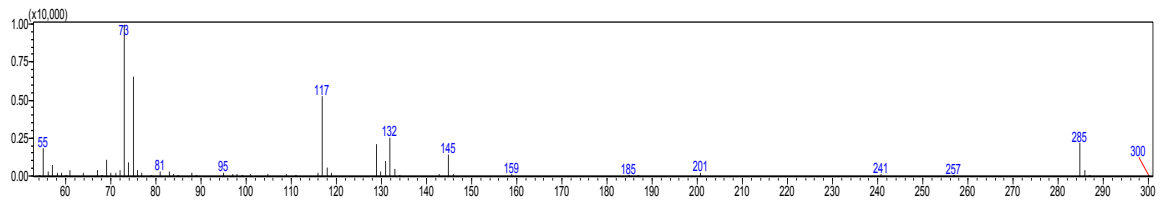
Janeiro - Ácido hexadecanóico



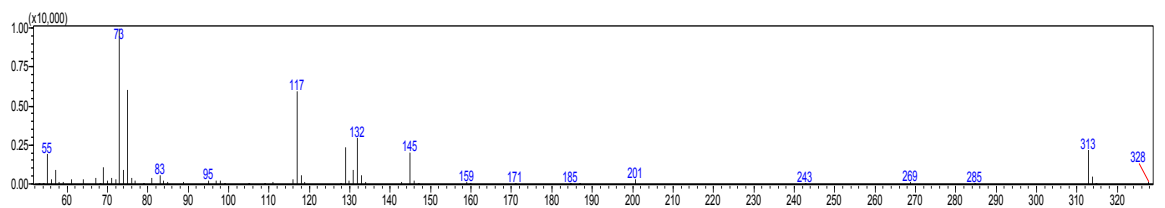
Fevereiro - Silano



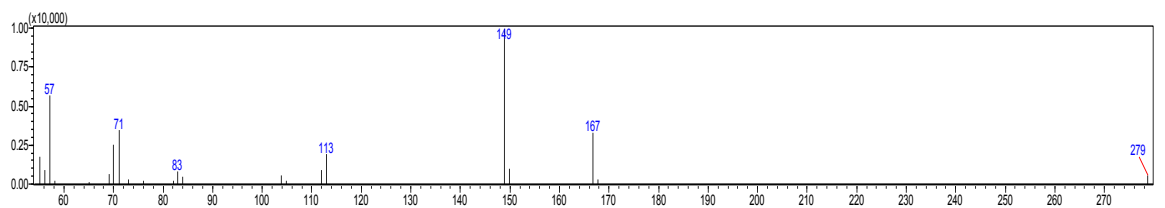
Março - Ácido tetradecanóico



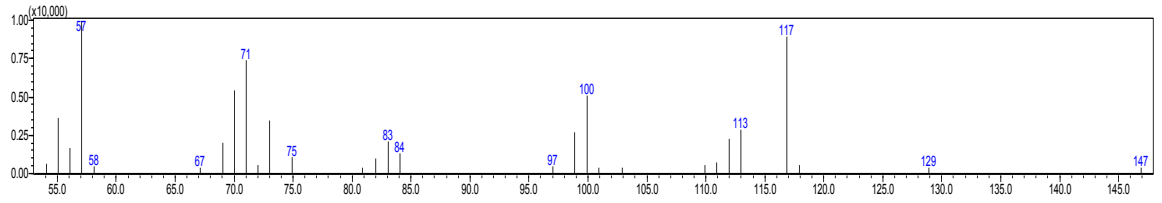
Abril - Ácido hexadecanoico



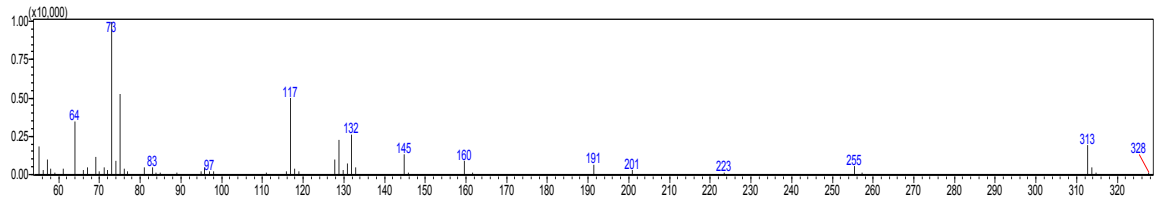
Mai - Di-n-octil ftalato



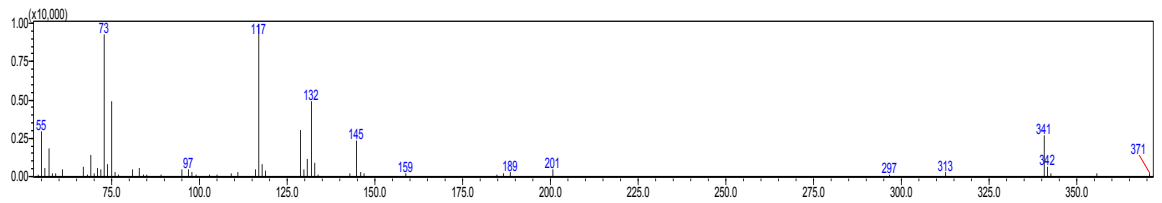
Junho - Ácido octadecanóico



Julho - Ácido hexadecanóico



Agosto - Ácido octadecanóico



Apêndice C

Tabela C1 – Características gerais das sequências de DNA das amostras analisadas

Ponto de coleta	Amostra	Mês de coleta	Características das sequências			
			Total de <i>reads</i>	Tamanho das <i>reads</i>	Percentual de CG	Total de bases
Montante	Água	Abril	1.430.145	199 ± 69	54 ± 12%	285.200.148 pb
		Julho	932.007	207 ± 67	52 ± 13%	193.328.104 pb
	Sedimento	Abril	1.967.739	179 ± 76	60 ± 12%	352.726.886 pb
		Julho	1.723.966	189 ± 74	56 ± 12%	325.670.395 pb
Jusante	Água	Abril	1.918.138	172 ± 74	55 ± 11%	330.673.903 pb
		Julho	1.824.791	173 ± 73	57 ± 11%	316.069.773 pb
	Sedimento	Abril	2.801.731	171 ± 79	60 ± 12%	478.901.181 pb
		Julho	3.323.685	161 ± 78	60 ± 12%	535.108.149 pb

Apêndice D

Perfil funcional das sequências metagenômicas

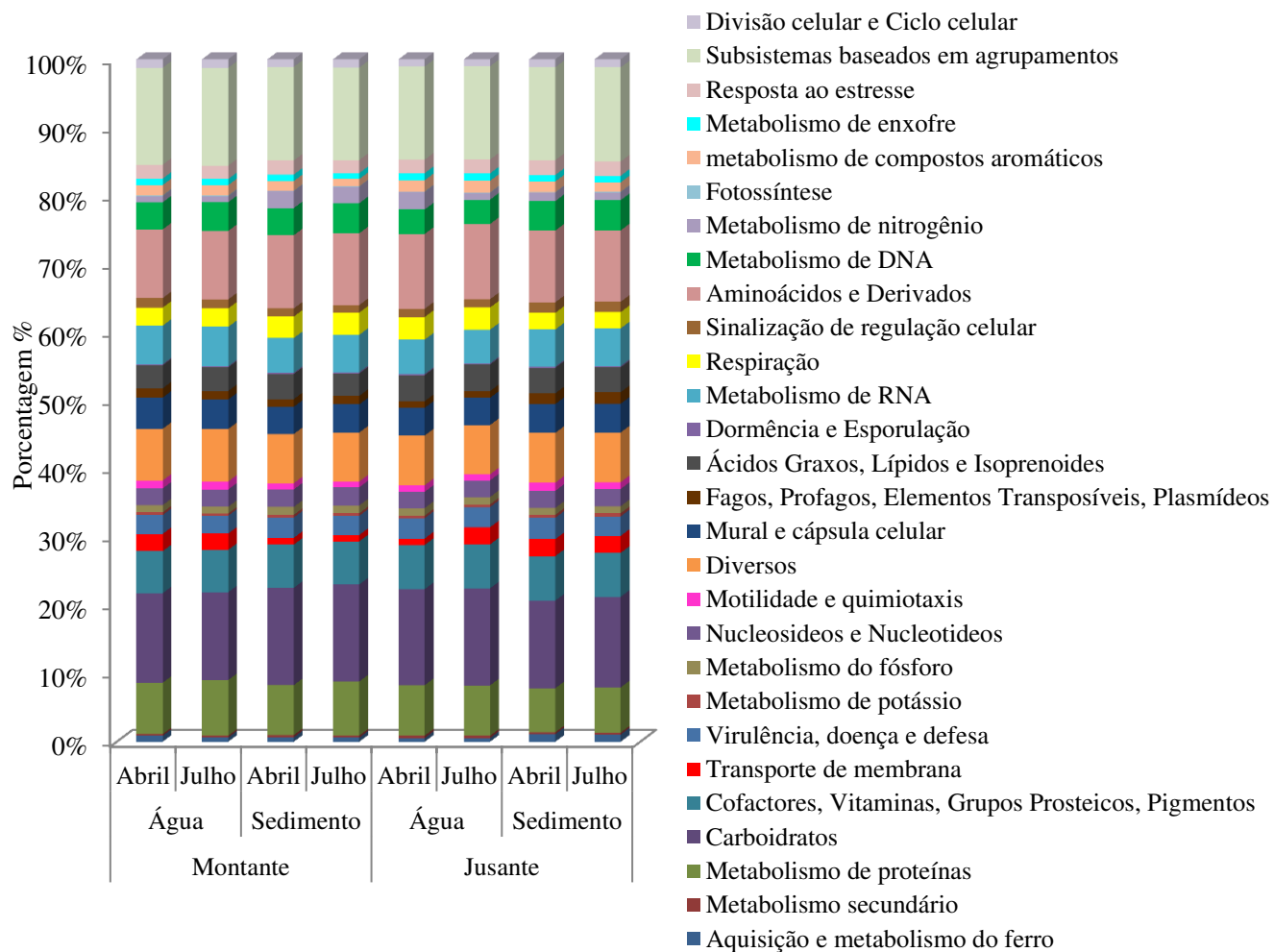


Figura D1 – Perfil funcional das sequências metagenômicas das amostras de água e sedimento a montante e a jusante do município de Viçosa.

ANEXOS

Anexo A

Tabela A1 – Variável que compõem do IPMCA e suas respectivas ponderações e níveis de qualidade

Grupos	Variáveis	Níveis	Faixas de Variação	Ponderação
Variáveis Essenciais (VE)	OD (mg/L)	A	$\geq 5,0$	1
		B	3,0 a < 5,0	2
		C	3,0 a < 5,0	3
	pH	A	6,0 a 9,0	1
		B	5,0 a < 6,0 e > 9,0 a 9,5	2
		C	< 5,0 e > 9,5	3
	Toxicidade	A	Não tóxico	1
		B	Efeito crônico	2
		C	Efeito agudo	3
Substâncias tóxicas (ST)	Cádmio (mg/L)	A	$\leq 0,001$	1
		B	> 0,001 a 0,005	2
		C	> 0,005	3
	Cromo (mg/L)	A	$\leq 0,05$	1
		B	> 0,05 a 1,00	2
		C	> 1,00	3
	Cobre (mg/L)	A	$\leq 0,009$	1
		B	>0,009 a 0,05	2
		C	>0,05	3
	Chumbo total (mg/L)	A	$\leq 0,01$	1
		B	> 0,01 a 0,08	2
		C	> 0,08	3
	Mercúrio (mg/L)	A	$\leq 0,0002$	1
		B	> 0,0002 a 0,001	2
		C	> 0,001	3
	Niquel (mg/L)	A	$\leq 0,025$	1
		B	> 0,025 a 0,160	2
		C	> 0,160	3
Surfactantes (mg/L)	A	$\leq 0,5$	1	
	B	> 0,5 a 1,0	2	
	C	> 1,0	3	
Zinco (mg/L)	A	$\leq 0,18$	1	
	B	>0,18 a 1,00	2	
	C	> 1,00	3	

Fonte: CETESB (2010)

Anexo B

Equação utilizada para calcular a concentração equivalente de 17- β -estradiol (EQ-E₂) com base na curva dose-resposta no ensaio YES

$$y = \left(\frac{A1 - A2}{1 + (x/x_0)^p} + A2 \right) \times 20$$

Onde:

y é o valor de Abs corrigida da amostra

$A1$ é a máxima indução da atividade estrogênica

$A2$ é o limite de detecção do ensaio

x é a CE₅₀ da amostra, corresponde à metade da atividade estrogênica da amostra

x_0 é a CE₅₀, ou seja, concentração que elucida uma atividade igual a 50% do controle positivo do 17 β -estradiol

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