

PRISCILA ROMANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE ESGOTO SANITÁRIO ANTES E APÓS
TRATAMENTO ANAERÓBIO**

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*.

Orientadora: Ann Honor Munteer

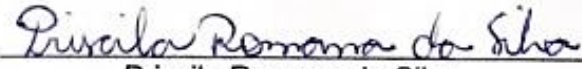
**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

PRISCILA ROMANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE ESGOTO SANITÁRIO ANTES E APÓS
TRATAMENTO ANAERÓBIO**

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: 30 de julho de 2019.


Priscila Romana da Silva
Autora


Ann Honor Mounteer
Orientadora

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

T

S586a
2019
Silva, Priscila Romana da, 1986-
Avaliação ecotoxicológica de esgoto sanitário antes e após
tratamento anaeróbio / Priscila Romana da Silva. – Viçosa, MG,
2019.
97f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Ann Honor Mounteer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-78.

1. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico. 2.
Danio rerio. 3. Estrógenos. 4. Peixes - Embriões.
5. Vitelogeninas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Civil. II. Título.

CDD 22 ed. 628.35

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida e saúde, por me conceder essa oportunidade e cuidar de mim e dos que amo de formas inimagináveis.

Ao meu esposo Ricardo, por todo amor, carinho, amizade e compreensão durante esse período. Aos meus pais, Sonia e Francisco, pelo amor, esforço, dedicação e constantes orações. Aos meus amados irmãos, Cristine, Giana e Filipe pela amizade, companhia, conselhos e incentivos.

À minha querida sogra e aos meus cunhados por todo apoio, e aos mais novos membros da família, Cecília, Enzo e Alice, que chegaram para encher nossos corações com muitas alegrias.

Aos amigos do LESA, Carlos, Capelão, Mônica, Agostinho, Júlio, Marcelo e Emerson, por tornarem o ambiente de trabalho, estudo e pesquisa tão acolhedor a todos os que passam por ele, sempre dispostos a ajudar.

Aos meus colegas de pesquisa e curso, Gemima, Andreiva, Nirlane, Eder, Elisa, Déborah, Natália, Victor, Bruna, Karina, Gabi, Iany e Tatiana, por toda ajuda, amizade, pelos momentos divididos, contribuições e cooperação.

À Mariana Xisto, pela ajuda com a análise ELISA.

Aos melhores estagiários, Edinael e Flávia, pelo compromisso e dedicação. Por me ajudarem até mesmo nas férias e nos finais de semana, sempre acompanhados de boas conversas e sobremesas.

Ao professor Eduardo Lanna, por disponibilizar o LabNut para os ensaios com os peixes. E à professora Aparecida Scatamburlo por disponibilizar o ultrafreezer.

À professora Ann, pela confiança em mim depositada e pela excelente orientação, fundamental para o desenvolvimento e conclusão dessa pesquisa.

Aos membros da banca, professor Laércio, que sempre solícito me ajudou em várias etapas dessa pesquisa, e professor Iván, pelos essenciais conselhos no cultivo dos peixes. Agradeço por contribuírem novamente para a finalização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa por tornar o mestrado possível através da concessão do afastamento parcial.

Às pessoas que não citei e que gentilmente contribuíram diretamente ou indiretamente em cada etapa.

Agradeço imensamente a todos que tornaram este trabalho possível.

BIOGRAFIA

Priscila Romana da Silva, filha de Sonia Martins Pereira e Francisco Assis da Silva, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, no dia 2 de maio de 1986.

Estudou na Escola Estadual Maurílio Albanese Novaes do ensino fundamental ao ensino médio. cursou Técnico em Química na Escola Técnica Vale do Aço e em janeiro de 2009 graduou-se em Engenharia de Produção na Faculdade Pitágoras de Ipatinga.

Em fevereiro de 2012, mudou-se para Viçosa, MG, para trabalhar como técnica de laboratório no Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Viçosa. No ano de 2016 concluiu o curso de especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho nessa instituição. Em março de 2017 ingressou no mestrado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da UFV, na área de concentração Sanitária e Ambiental, vindo a concluir em julho de 2019.

RESUMO

SILVA, Priscila Romana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Avaliação ecotoxicológica de esgoto sanitário antes e após tratamento anaeróbio.** Orientadora: Ann Honor Mounteer.

Em virtude da natureza diversa dos produtos de uso doméstico e dos processos industriais, os efluentes urbanos, mesmo após tratamento, podem lançar nos corpos d'água diversos compostos potencialmente tóxicos à biota aquática. Dentre eles estão alguns compostos que apresentam estrogenicidade e são capazes de causar distúrbios no sistema reprodutivo de animais e, até mesmo, de seres humanos. A legislação brasileira determina que o efluente de sistemas de tratamento de esgotos sanitários não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos do corpo receptor, e recomenda o uso de ensaios ecotoxicológicos para avaliar esses efeitos em organismos-teste. Nos últimos anos, devido às preocupações com o bem-estar animal, métodos alternativos foram desenvolvidos visando a substituição de testes de toxicidade aguda com peixes adultos por ensaios com embriões de peixes. Nesse sentido, esse trabalho avaliou a adequabilidade de ensaios com durações de 96 h e 168 h com embriões do peixe *Danio rerio* em amostras de esgoto sanitário, e a estrogenicidade dos esgotos antes e após tratamento biológico anaeróbio por meio de ensaios *in vitro* (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) e *in vivo* (indução de vitelogenina em *D. rerio*). Para avaliar a adequabilidade dos ensaios com embriões, os resultados obtidos foram comparados aos ensaios agudos e crônicos com os peixes adultos e larvas de *D. rerio* e com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Os resultados demonstraram que o tratamento anaeróbio, apesar de apresentar todos os valores dos parâmetros físico-químicos abaixo do exigido pelas legislações, não removeu a toxicidade do esgoto, e foi classificado como extremamente tóxico para larvas de peixe e para o microcrustáceo, e altamente tóxico para os embriões de peixe. Os ensaios com embriões se mostraram adequados para a avaliação de toxicidade aguda e crônica em esgotos sanitários, sendo que o ensaio de 96 h apresentou sensibilidade similar à do ensaio agudo com peixe adulto. Não foram identificadas diferenças significativas na indução de vitelogenina entre os organismos expostos aos esgotos em comparação ao controle. No entanto, o ensaio *in vitro* demonstrou que o tratamento

realizado aumentou a estrogenicidade da amostra de 27 para 40 ng equivalentes de 17- β estradiol (EQ-E2) L⁻¹, resultado reforçado pela maior indução de vitelogenina nos peixes machos expostos às concentrações de 5% (2,73 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e 20% (2,12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) do esgoto tratado em comparação com as mesmas concentrações do esgoto bruto (0,174 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na exposição de 5% e 0,188 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em 20%).

Palavras-chave: *Danio rerio*. Estrogenicidade. FET. Reator UASB. Vitelogenina. YES.

ABSTRACT

SILVA, Priscila Romana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019.
Ecotoxicological evaluation of sewage before and after anaerobic treatment.
Adviser: Ann Honor Munteer.

Due to the diverse nature of household products and industrial processes, urban wastewater, even after treatment, can release to receiving waters a variety of compounds that are potentially toxic to aquatic wildlife. These include estrogenic compounds that can cause disturbances in reproductive systems of animals, including humans. Brazilian law states that effluent from sanitary sewage treatment systems shall not cause or have the potential to cause toxic effects to aquatic organisms in the receiving water body and recommends the use of ecotoxicological assays to evaluate these effects on test organisms. In recent years, due to concerns about animal welfare, alternative methods have been developed to replace acute toxicity tests with adult fish by tests on fish embryos. This study evaluated the suitability of 96 h and 168 h *Danio rerio* fish embryo tests to assess sanitary sewage toxicity and the estrogenicity of sewage before and after anaerobic biological treatment by *in vitro* (yeast *Saccharomyces cerevisiae*) and *in vivo* (vitellogenin induction in *D. rerio*) assays. To evaluate the suitability of fish embryo assays, the results were compared to acute and chronic assays with *D. rerio* adult fish and larvae and to the chronic assay with the microcrustacean *Ceriodaphnia dubia*. The results showed that anaerobic treatment, despite meeting legal limits for physicochemical parameters, did not remove sewage toxicity, and treated sewage was classified as extremely toxic to *D. rerio* larvae and *C. dubia*, and highly toxic to fish embryos. Embryo assays were suitable for the evaluation of acute and chronic toxicity in sanitary sewage and the 96 h assay showed similar sensitivity to the acute adult fish assay. No significant differences were identified in vitellogenin induction among organisms exposed to sewage compared to control. However, the *in vitro* test showed that anaerobic treatment increased sample estrogenicity from 27 to 40 ng equivalents of 17- β estradiol (EQ-E2) L⁻¹, a result corroborated by the greater induction of vitellogenin in male fish exposed to 5% (2.73 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and 20% (2.12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) treated sewage compared to the same concentrations as raw sewage (0.174 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ at 5% exposure and 0.188 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ by 20%).

Keywords: *Danio rerio*. Estrogenicity. FET. UASB reactor. Vitellogenin. YES.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Agência Nacional das Águas
CE	Condutividade Elétrica
CE(I) ₅₀	Concentração de Efeito Nominal 50%
CERH-MG	Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais
CL(I) ₁₅	Concentração Letal Nominal 15%
CL(I) ₅₀	Concentração Letal Nominal 50%
CMT	Concentração Máxima Tolerada
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COPAM	Conselho Estadual de Política Ambiental
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CPRG	<i>Chlorophenol Red-β-D-galactopyranoside</i> (clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo)
DE	Desreguladores Endócrinos
DIN	<i>Deutsches Institut Für Normung</i> (Instituto Alemão para Normalização)
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxigênio (5 dias a 20°C)
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQO _s	Demanda Química de Oxigênio (solúvel)
E1	Estrona
E2	17 β-estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α-etinilestradiol
EFS	Extração em Fase Sólida
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunossorvente ligado a enzima)
EQ-E2	Equivalentes de 17β-estradiol
ETE	Estações de Tratamento de Esgotos
FET	<i>Fish Embryo Toxicity Test</i> (Teste de toxicidade com embriões de peixe)
H	Constante adimensional de Henry
HPA	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i> (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos)
N-NH ₃	Nitrogênio Amoniacal Total

NKT Nitrogênio Kjeldahl Total

OD Oxigênio Dissolvido

OCDE Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PCB *Polychlorinated Biphenyl* (Bifenilas Policloradas)

pH potencial Hidrogeniônico

REACH *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*
(Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas)

REh Receptor de Estrogênio humano

RT - PCR *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa)

S²⁻ Sulfeto Solúvel

SSF Sólidos Suspensos Fixos

SST Sólidos Suspensos Totais

SSV Sólidos Suspensos Voláteis

ST Sólidos Totais

STF Sólidos Totais Fixos

STV Sólidos Totais Voláteis

TDH Tempo de Detenção Hidráulica

UASB *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors* (Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo)

VCest Valor Crônico Estimado

VTG Vitelogenina

YES *Yeast Estrogen Screen*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1	Tratamento biológico anaeróbio e toxicidade dos esgotos sanitários	16
3.2	Desregulação endócrina.....	19
3.3	Ensaio ecotoxicológicos aquáticos	21
3.3.1	Microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	23
3.3.2	Peixe <i>Danio rerio</i>	24
3.3.3	Ensaio FET.....	25
3.3.4	Ensaio YES	27
3.3.5	Vitelogenina (VTG) – função e quantificação	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Plano experimental.....	31
4.2	Esgotos	31
4.3	Caracterização físico-química	32
4.4	Seleção e manutenção dos peixes.....	33
4.4.1	Cultivo dos peixes	33
4.4.2	Reprodução e coleta dos ovos	34
4.5	Ensaio de sensibilidade	35
4.6	Toxicidade aguda	36
4.6.1	Embriões	36
4.6.2	Peixe adulto.....	39
4.7	Toxicidade crônica	39
4.7.1	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	40
4.7.2	Embriões - toxicidade crônica de curta duração.....	40
4.7.3	Larvas.....	40
4.8	Atividade estrogênica	41
4.8.1	Ensaio YES	41
4.8.2	Ensaio de vitelogenina (VTG).....	45
4.9	Análise dos dados	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Ensaio de sensibilidade	54
5.2	Ensaio preliminares	54

5.3	Caracterização físico-química dos esgotos nos ensaios definitivos	57
5.4	Toxicidade aguda e crônica.....	58
5.4.1	FET 96 h e peixe adulto	58
5.4.2	FET 96 h e FET 168 h.....	59
5.4.3	Larvas.....	62
5.4.4	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	62
5.5	Atividade estrogênica	64
5.5.1	Ensaio YES	64
5.5.2	Ensaio de vitelogenina (VTG).....	66
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A – Informações do reator UASB utilizado na pesquisa.....	79
	APÊNDICE B – Informações do ensaio agudo com peixe adulto.....	80
	APÊNDICE C – Comparação do desenvolvimento dos organismos no ensaio FET nas duas amostras	81
	APÊNDICE D – Desenvolvimento diário dos organismos no ensaio FET no esgoto bruto	83
	APÊNDICE E – Desenvolvimento diário dos organismos no ensaio FET no esgoto tratado	86
	APÊNDICE F – Resultados do ensaio de indução de VTG.....	89
	ANEXO A – Certificado de aprovação da CEUA/UFV para o desenvolvimento da pesquisa com peixes	95
	ANEXO B – Tratamento estatístico do ensaio preliminar	96
	ANEXO C – Cálculo da concentração de amônia livre.....	97

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente está relacionada ao crescimento populacional, ao uso inadequado do solo e à expansão das atividades humanas na indústria, comércio e agricultura. O lançamento de esgotos sem tratamento ou apenas parcialmente tratados nos corpos receptores, pode causar efeitos adversos aos usos benéficos das águas. No Brasil, esses lançamentos ainda constituem a principal fonte de poluição dos recursos hídricos (BICKHAM, 2000; JORDÃO; PÊSSOA, 2011).

Os esgotos sanitários são constituídos de despejos gerados em instalações hidráulico-sanitárias de residências, edifícios comerciais, industriais e de serviços, além de uma parcela de águas pluviais e águas de infiltração. Compõem-se essencialmente de matéria orgânica biodegradável; nutrientes, como fósforo e nitrogênio; organismos patogênicos; metais e matéria orgânica não biodegradável, como pesticidas, detergentes e fármacos (JORDÃO; PÊSSOA, 2011; VON SPERLING, 2018).

Para o lançamento desses despejos nos corpos d'água é necessário um tratamento prévio que atenda os padrões de emissão, definidos por lei, que visam a preservação dos recursos hídricos e a manutenção da vida aquática.

As Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) normalmente empregam processos biológicos como principal tecnologia de tratamento, objetivando principalmente a redução de poluentes orgânicos, nutrientes e microrganismos patogênicos. Dentre as tecnologias mais encontradas no Brasil, os reatores anaeróbios ocupam o segundo lugar e estão presentes como o único mecanismo de tratamento em 328 ETE, devido, principalmente, aos baixos custos de implantação e operação (ANA, 2017).

Em virtude da natureza diversa dos processos industriais e dos produtos de uso doméstico, os efluentes urbanos, mesmo após o tratamento, podem lançar nos corpos d'água diversos compostos potencialmente tóxicos à biota aquática, o que vem despertando grande interesse da comunidade científica e preocupação pública. Dentre eles estão os chamados desreguladores endócrinos (DE), compostos capazes de causar distúrbios nos órgãos reprodutores de animais e até mesmo de seres humanos. Entre os principais DE estão fármacos, hormônios naturais, pesticidas, substâncias presentes em produtos de limpeza e higiene pessoal, e compostos

aplicados na produção de plásticos e resinas, que apresentam estrogenicidade (THE CADMUS GROUP, 2009).

A Resolução número 430, de 2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), e a Deliberação Normativa Conjunta do Conselho Estadual de Política Ambiental (COPAM) e do Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais (CERH-MG), de 2008, estabelecem padrões físico-químicos de lançamento de diversos efluentes e determinam que o efluente de sistemas de tratamento de esgotos sanitários não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor.

Os ensaios ecotoxicológicos são capazes de sinalizar os potenciais tóxicos e os mecanismos de ação de compostos químicos em diferentes organismos. Configuram uma ferramenta de avaliação ambiental de fundamental importância, pois alguns fatores essenciais não são avaliados por variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes sobre os organismos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Os organismos aquáticos utilizados em ensaios ecotoxicológicos devem ser sensíveis a uma diversidade de agentes químicos, de ampla distribuição geográfica, abundantes e disponíveis ao longo do ano, possuir estabilidade genética e, por fim, ser de fácil manutenção em laboratório. Os principais organismos que atendem a esses requisitos estão entre os grupos de bactérias, algas, microcrustáceos e peixes. Os métodos com microcrustáceos e peixes foram desenvolvidos, normalizados, estão mundialmente em uso e fazem parte das exigências legais dos órgãos ambientais em diversos países (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Nos ensaios de toxicidade aguda, em que os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste em um curto período, animais vertebrados podem sofrer grave aflição e dor, o que entra em conflito com as legislações de bem-estar animal elaboradas, principalmente, na Europa. Essa preocupação ética levou ao desenvolvimento de técnicas alternativas para substituição dos ensaios com peixes, como por exemplo, os testes de citotoxicidade. No entanto, os ensaios com embriões de peixe têm se apresentado mais sensíveis e retratam melhor a toxicidade em peixes adultos, além de não transgredirem as legislações europeias, pois os peixes em seus estádios embrionário e larval não são protegidos (BRAUNBECK *et al.*, 2014; LAMMER *et al.*, 2009). Atualmente, a

alternativa mais promissora de toxicidade aguda à peixes é o teste FET (Fish Embryo Toxicity Test) com duração de 96 h, realizado com embriões do peixe *Danio rerio* e proposto pela OCDE (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico) para avaliação de toxicidade aguda em amostras de produtos químicos (OCDE, 2013).

Ao considerar a necessidade de adequação ética dos ensaios de toxicidade aguda com peixes e a escassez de informações acerca dos riscos provenientes dos esgotos sanitários, abordagens de monitoramento com base nos efeitos causados a organismos expostos são indispensáveis, pois fornecem informações importantes para o entendimento do potencial impacto ambiental do lançamento de esgotos à biota aquática.

Nesse sentido, este trabalho avaliou: (1) a adequabilidade do ensaio FET com durações de 96 h e 168 h em amostras de esgoto sanitário, principalmente quanto a sua repetibilidade e sensibilidade comparada aos resultados de ensaios agudos e crônicos com peixes adultos, larvas e microcrustáceo; e (2) a estrogenicidade dos esgotos antes e após o tratamento por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar os efeitos tóxicos de esgotos urbanos antes e após o tratamento biológico anaeróbio.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade de resposta de diferentes bioensaios para quantificar toxicidades aguda e crônica de esgotos.
- Avaliar a ocorrência de efeito estrogênico em organismos expostos aos esgotos bruto e tratado por processo biológico anaeróbio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tratamento biológico anaeróbio e toxicidade dos esgotos sanitários

Os serviços de esgotamento sanitário brasileiros apresentam insuficiência no atendimento, o que resulta em uma fração expressiva de esgotos sem tratamento disposta diretamente nos corpos d'água. Com isso, há um comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, com consequências nocivas ao equilíbrio ambiental e à saúde da população.

Dados de 2017 do Atlas Esgotos, da Agência Nacional das Águas (ANA), apresentam a realidade do esgotamento sanitário no Brasil no ano de 2013: do total de 5.570 municípios e uma população urbana de 169.780.605 habitantes, 43% é atendida por rede coletora e estação de tratamento de esgotos; 12% é atendida por solução individual (fossa séptica); 18% da população se enquadra na realidade em que os esgotos são coletados mas não são tratados; e 27% não é atendida por coleta e nem tratamento de esgotos.

Os esgotos, quando coletados e enviados para as ETE, passam por níveis de tratamento que visam a remoção de poluentes para adequação aos padrões de qualidade e lançamento nos corpos receptores. Como primeira etapa, o tratamento preliminar objetiva apenas a remoção dos sólidos grosseiros, com o uso de grades e desarenadores. A segunda etapa, designada como tratamento primário, visa a remoção de parte dos sólidos suspensos, incluindo matéria orgânica particulada. No tratamento secundário, terceira etapa, predominam os mecanismos biológicos, em que o objetivo principal é a remoção da matéria orgânica biodegradável (em solução ou em suspensão), e eventualmente, a remoção de nutrientes. Por fim, o tratamento terciário, ou avançado, objetiva a remoção de poluentes específicos ou poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário. Para fins de reuso, o tratamento avançado é requerido para remoção de compostos que permanecem após as etapas anteriores. Em países em desenvolvimento é raro encontrar ETE que aplicam o tratamento terciário (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 2018).

No tratamento biológico, as substâncias orgânicas biodegradáveis, coloidais ou dissolvidas, são basicamente convertidas por microrganismos em gases que podem escapar para a atmosfera, em substâncias mineralizadas inertes, e em tecido celular

biológico que pode ser removido por sedimentação ou por outro processo de separação (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 2016).

No Brasil, a tecnologia dos Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo, ou reatores UASB, do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors*, possui grande aceitação e disseminação, sendo encontrada como unidade única ou seguida de alguma forma de pós-tratamento. Nos reatores, o fluxo do líquido é ascendente, com uma zona de digestão, uma zona de sedimentação e um dispositivo separador de fases (gás, sólido e líquido). Uma massa de microrganismos cresce dispersa no meio e pode formar pequenos grânulos pela aglutinação de diversas espécies microbianas, gerando uma concentração elevada de biomassa (manta de lodo). Após ser distribuído pelo fundo do reator, o esgoto segue uma trajetória ascendente, em contato com a manta de lodo ocorre a biodegradação e a digestão anaeróbia do conteúdo orgânico, tendo como subproduto a geração de gases (principalmente metano e gás carbônico). Na parte superior do reator o efluente sai do compartimento de sedimentação relativamente clarificado, e a concentração de biomassa no reator é mantida elevada (CHERNICHARO, 2007; METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 2016).

Os reatores UASB possuem diversas vantagens em comparação aos processos aeróbios convencionais, principalmente em países de clima quente que são capazes de propiciar condições ideais para a atividade microbiana. É um sistema compacto, com baixa demanda de área e sua implantação e operação são de baixo custo. A produção de lodo biológico é reduzida, bem como o consumo de energia elétrica. Além disso, produz metano, uma fonte potencial de energia. Embora essa tecnologia apresente muitas vantagens, também são encontradas desvantagens, como a possibilidade de emissão de maus odores, baixa capacidade em tolerar cargas tóxicas e elevado período de partida para o desenvolvimento da biomassa (CHERNICHARO, 2007; METCALF; EDDY, 2016).

Os processos anaeróbios, ao contrário dos aeróbios, dificilmente produzem efluentes capazes de atender aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental, com eficiência de remoção de DQO e DBO da ordem de 65 a 75%. Torna-se necessário, portanto, o pós-tratamento dos efluentes, como forma de completar a remoção da matéria orgânica e proporcionar a remoção de constituintes pouco afetados no tratamento, como os nutrientes nitrogênio e fósforo, visto que a presença

desses constituintes nos corpos d'água gera a degradação da qualidade ambiental (CHERNICHARO, 2007; VON SPERLING, 2018).

A descarga de nutrientes em cursos d'água é responsável pelo crescimento excessivo de plantas aquáticas (fenômeno conhecido como eutrofização) e responsável por alguns efeitos indesejáveis no corpo receptor. Um dos problemas causados pela eutrofização é a produção de condições anaeróbias no fundo do corpo d'água pela ausência de luz (ausência de fotossíntese) e pelo consumo de oxigênio dissolvido pelas bactérias heterotróficas que se alimentam da matéria orgânica das algas sedimentadas. Outro efeito indesejável e preocupante é a eventual mortalidade de peixes, que pode ocorrer em função da anaerobiose e por toxicidade de amônia (VON SPERLING, 2018). As membranas celulares dos peixes são permeáveis à amônia livre (NH_3) por apresentarem afinidade com compostos lipofílicos, e relativamente impermeáveis pelo íon amônio (NH_4^+). Em condições de pH elevado, frequentes durante a fase de elevada fotossíntese (pela retirada de acidez carbônica), a amônia apresenta-se em grande parte na forma livre, tóxica aos peixes, ao invés de na forma ionizada, não tóxica (RANDALL; TSUI, 2002; VON SPERLING, 2018).

Em virtude da natureza diversa dos processos industriais e dos produtos de uso doméstico, os efluentes urbanos contêm diversos compostos nocivos, dentre esses compostos estão os micropoluentes aquáticos, com destaque para os DE, que são substâncias exógenas ou misturas capazes de interferir em funções do sistema endócrino, na fisiologia e na reprodução de diversos animais (BRICIU, KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2009). As concentrações desses compostos, embora muito baixas (ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$), são suficientes para induzir respostas estrogênicas e alterar a reprodução normal e o desenvolvimento de alguns seres vivos.

As possíveis formas de remoção dos micropoluentes, incluindo os DE, nos processos de tratamento de efluentes incluem degradação abiótica, degradação biológica e adsorção nos sólidos (HAMID; ESKICIOGLU, 2012). A biodegradação dos DE é uma das transformações mais significativas no tratamento de esgoto, no entanto, o processo é limitado de forma cinética devido às baixas concentrações desses compostos no esgoto bruto. A maioria desses microcontaminantes apresenta cinética de degradação de pseudo-primeira ordem (a taxa de transformação biológica é diretamente proporcional à concentração dos compostos presentes na fase líquida). Dessa forma, devido à baixa remoção desses compostos durante o tratamento

convencional, as ETE estão entre as principais fontes de distribuição de DE nos cursos d'água (SUÁREZ *et al.*, 2008; THE CADMUS GROUP, 2009).

3.2 Desregulação endócrina

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que regula e integra funcionalidades de diferentes células, é responsável pelo crescimento, reprodução, manutenção, metabolismo e homeostase. Consiste em várias glândulas (pineal, hipófise, tireoide, paratireoide, supra-renais, pâncreas e gônadas) em diferentes partes do corpo que produzem hormônios com diferentes funções. Os hormônios sintetizados pelas glândulas são transportados pela corrente sanguínea para órgãos-alvo, onde são usados para produzir uma resposta natural. Quando os hormônios se ligam ao receptor, o local efetor correspondente (receptor terminal) é alterado e produz a resposta desejada (Figura 1a) (BIRKETT; LESTER, 2002).

Os hormônios atuam em concentrações muito baixas e em momentos precisos, pois os receptores possuem afinidade muito alta para um hormônio específico. Apesar de sua alta afinidade por hormônios, esses receptores também são capazes de se ligar a compostos químicos exógenos presentes em baixas concentrações no organismo (BIRKETT; LESTER, 2002; MONNERET, 2017).

Algumas substâncias químicas podem interferir de várias maneiras nos sistemas hormonais naturais e produzir uma resposta ou interrupção indesejada, podendo afetar a saúde, o crescimento e a reprodução de diversos organismos. Essas substâncias são designadas como DE. A desregulação do sistema endócrino ocorre quando os DE interrompem a síntese, imitam, bloqueiam ou removem os hormônios naturais dos seus receptores, provocando efeitos adversos sobre a saúde de um organismo, sua descendência ou subpopulações (BIRKETT; LESTER, 2002; OCDE, 2012; MONNERET, 2017).

Quando a ação de um hormônio é mimetizada pela ligação da substância química ao receptor, ativando uma resposta e simulando a ação de um hormônio, o fenômeno é chamado de efeito agonista (Figura 1b). No caso em que uma substância se liga a um receptor, sem produzir respostas, e impede a interação de um hormônio natural, o fenômeno é denominado efeito antagonista (Figura 1c) (BIRKETT; LESTER, 2002).

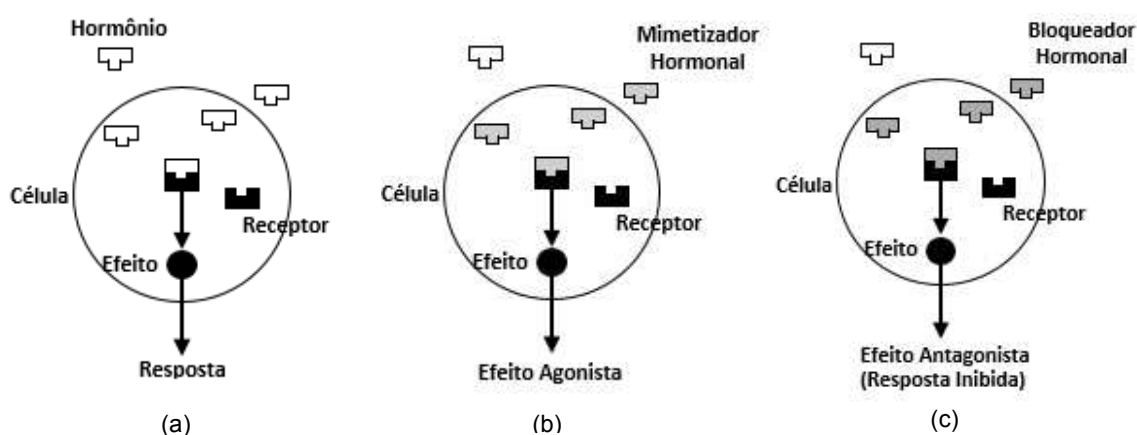


Figura 1 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação dos DE. (a) hormônios naturais acoplados aos receptores e transmitindo resposta desejada. (b) DE se ligam ao receptor ativando uma resposta agonista. (c) DE se ligam ao receptor e bloqueiam os sinais normais dos hormônios naturais. Fonte: Adaptado de Birkett e Lester (2002).

Os DE podem ser agrupados em duas principais classes de substâncias: sintéticas e naturais. Exemplo comum de substâncias sintéticas utilizadas na agricultura são os pesticidas. Na indústria, são encontradas as dioxinas, bifenilas policloradas (PCB), alquifenóis e seus subprodutos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP), ftalatos, bisfenol A, metais pesados e fármacos (estrogênios sintéticos). As substâncias naturais classificadas como DE são os fitoestrogênios, como a genisteína e o metaresinol, e os estrogênios naturais como estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3) (BILA; DEZOTTI, 2007).

Vários estudos demonstram o efeito da exposição aos DE. Em grande parte tratam-se de pesquisas *in vivo* em espécies animais aquáticas e terrestres (microcrustáceos, peixes e roedores). Os estudos com seres humanos são predominantemente relativos à exposição ocupacional ou acidental e estudos *in vitro* (BRICIU; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2009; THE CADMUS GROUP, 2009).

Na década de 1990, foram observados diversos casos de feminização de peixes devido à presença de compostos estrogênicos (hormônios femininos naturais ou sintéticos) presentes em efluentes das ETE (JOBILING *et al.*, 1998; PURDOM *et al.*, 1994). Nas décadas seguintes, inúmeros estudos também relacionaram efeitos dos DE em alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos, na diminuição na eclosão de ovos de pássaros, tartarugas e peixes, e também na incidência de câncer de mama, próstata e testículo em seres humanos (BILA; DEZOTTI, 2007).

Entre os DE destacam-se os estrogênios, que são hormônios responsáveis pelo desenvolvimento de características femininas em um organismo. Entre suas principais funções estão o estímulo ao desenvolvimento do endométrio e dos seios, a regulação do ciclo menstrual e a atuação sobre o desenvolvimento do organismo como um todo (BRICIU; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2009). Estrogênios naturais, como E1, E2 e E3, são produzidos e excretados por mulheres e animais vertebrados fêmeas. O fármaco 17 α -etinilestradiol (EE2), amplamente utilizado em pílulas anticoncepcionais, é um hormônio sintético e, habitualmente, é a principal referência na literatura em estudos com DE, pois apresenta maior atividade de desregulação endócrina que os hormônios naturais (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; BRICIU, KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2009).

No Brasil, Ghiselli (2006), em avaliação de águas superficiais, água potável e esgoto doméstico, identificou e quantificou diversos DE. Dentre os compostos monitorados e frequentemente detectados nas águas superficiais e potável estavam o E2 (em concentrações de 1,8 a 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e EE2 (1 - 3,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Amostras de esgoto bruto e tratado em ETE também foram monitoradas e apresentaram concentrações muito próximas aos valores encontrados em águas superficiais, indicando a ineficiência do tratamento empregado na unidade de tratamento na remoção dos DE.

Froehner *et al.* (2011) avaliaram a remoção de cafeína, hormônios e bisfenol-A em três ETE. Na primeira estação, o esgoto era tratado pelo processo de lodos ativados; na segunda, o tratamento era realizado por reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) seguido por flotação por ar dissolvido; e na terceira, o esgoto era tratado por lagoas de estabilização. Foram observadas diferenças na eficiência de remoção dos micropoluentes entre as três ETE, provavelmente devido ao tempo de detenção hidráulica (TDH). Cafeína e bisfenol-A foram quase completamente removidos nas três unidades de tratamento; no entanto, a remoção de hormônios foi menor. Os autores concluíram também que hormônios, cafeína e bisfenol-A encontrados no meio ambiente definitivamente são oriundos do esgoto não tratado.

3.3 Ensaios ecotoxicológicos aquáticos

A ecotoxicologia aquática estuda os efeitos de substâncias químicas ou agentes tóxicos sobre organismos representativos do ecossistema aquático (COSTA *et al.*, 2008). Com testes padronizados é possível estimar as concentrações e a

duração da exposição que produzem efeitos críticos, como alterações no crescimento, reprodução, comportamento, patologias, fisiologia e mortalidade dos organismos-teste. Esses ensaios proporcionam uma base de dados que possibilitam a avaliação do risco associado às condições de exposição e permitem a reprodução dos testes em diferentes laboratórios (COSTA *et al.*, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os ensaios de toxicidade conduzidos em laboratório são relativamente simples, não requerem métodos analíticos sofisticados e onerosos e fornecem resultados imprescindíveis para prever possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes no ambiente (COSTA *et al.*, 2008). Relações de causa-efeito podem ser estabelecidas a partir desses testes devido ao elevado controle das condições utilizadas, como temperatura, qualidade da água e fotoperíodo (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008).

É aconselhável que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, preferencialmente pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, com o propósito de que os resultados proporcionem informações relevantes sobre a toxicidade da solução-teste para diferentes tipos de organismos, sob determinadas condições (COSTA *et al.*, 2008). Esses organismos-teste são geralmente espécies abundantes e disponíveis, de fácil manipulação e manutenção e que possuam informações científicas acessíveis sobre seu comportamento, genética e fisiologia (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os testes de toxicidade avaliam efeitos agudos ou crônicos. Os testes agudos são realizados em curtos períodos em relação ao período de vida do organismo-teste, geralmente de 24 a 96 h, e os efeitos críticos analisados são a mortalidade ou a imobilidade dos organismos. O objetivo nesses ensaios é determinar a concentração da solução-teste ou a intensidade de um agente que produza um efeito prejudicial ao organismo. Os valores de concentrações efetivas ou letais são normalmente expressos em relação a 50% dos organismos (COSTA *et al.*, 2008; MAGALHÃES; FERRÃO, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os testes de toxicidade crônica detectam os efeitos subletais em períodos mais longos do que os ensaios agudos. Utilizam parte do ciclo de vida ou estádios iniciais de vida dos organismos-teste. Esses ensaios permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições em que os organismos são capazes de sobreviver, mas passam a ter suas funções biológicas, tais como reprodução,

crescimento e desenvolvimento de ovos afetadas (COSTA *et al.*, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

No decorrer dos ensaios de toxicidade três métodos de adição e/ou renovação das soluções-teste são possíveis: estático, semiestático e dinâmico. Ensaio estático são realizados sem renovação das soluções-teste; são indicados para amostras que não cause depleção de oxigênio do meio, que não são voláteis e que são estáveis em meio aquoso. Nos ensaios semiestáticos as soluções-teste são renovadas periodicamente. São recomendados para amostras com características muito distintas das encontradas nas águas naturais, o que pode causar estresse ou mortalidade dos organismos-teste, superestimando os resultados de toxicidade, como por exemplo, baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Em contrapartida, substâncias tóxicas instáveis ou voláteis têm suas concentrações reduzidas no período do ensaio, contribuindo para a subestimação dos resultados. Por fim, os testes dinâmicos são aplicados em ensaios de toxicidade crônica de longa duração, com renovação contínua da solução-teste (ABNT, 2016; COSTA *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos em testes de toxicidade podem ser expressos como concentração letal (CL₅₀), concentração que causa mortalidade de 50% dos organismos; e em concentração de efeito (CE₅₀), concentração de amostra que causa um efeito (imobilidade ou inibição na reprodução, por exemplo) a 50% dos organismos, no tempo de exposição e nas condições do teste (COSTA *et al.*, 2008).

3.3.1 Microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*

A *C. dubia*, também conhecida como pulga-d'água, pertence à ordem Cladocera e é encontrada na Europa e na América do Norte. É uma importante fonte de alimento para peixes. Sua reprodução é partenogenética, dando origem a populações constituídas inteiramente por fêmeas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Possui um corpo ovalado de 0,8 a 0,9 mm de comprimento e pernas torácicas compostas por cerdas (Figura 2). Os cladóceros são consumidores primários de ambientes dulcícolas e alimentam-se por filtração. Suas pernas agem como peneiras, retendo algas, bactérias e pequenas partículas de material orgânico da água. O alimento é então transferido para a boca, onde é moído pelas mandíbulas, e direcionado para o trato digestivo (ABNT, 2017; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

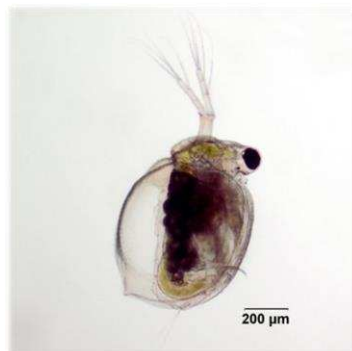


Figura 2 – Microcrustáceo *C. dubia*
Fonte: Haney, J.F. *et al.* (2019).

Esses organismos são amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade de águas e efluentes pois são bastante sensíveis a poluentes, são facilmente cultivados em laboratório, possuem curto ciclo de vida, altas taxas reprodutivas e necessitam de pequenos volumes de amostras. Os efeitos observados são a sobrevivência e a inibição da reprodução em um período de exposição de sete dias, podendo ser estendido até o oitavo dia (ABNT, 2017; ANSELMO *et al.*, 2018).

3.3.2 Peixe *Danio rerio*

O peixe-zebra, também conhecido como paulistinha e *zebrafish*, é um peixe tropical de água doce, nativo de rios do sul da Ásia (Figura 3). Foi descrito em 1822 por Francis Buchanan-Hamilton. Possui de 3 a 4 cm de comprimento, nadadeiras anal e caudal e listras pretas e brancas ao longo do corpo. Os machos são alongados, delgados e levemente dourados, e apresentam a lista abdominal completa. As fêmeas são robustas, prateadas e ligeiramente maiores que os machos, com a lista abdominal incompleta (ABNT, 2016; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).



Figura 3 – Peixe-zebra, macho (acima) e fêmea.
Fonte: Water Supplies Department (2015)

A idade ideal para acasalamento é dos 4 aos 24 meses de idade, a proporção adequada para obter boa quantidade de ovos é dois machos para cada fêmea; no entanto, a proporção de 1:1 também é aceitável. O ciclo ovariano do peixe-zebra se completa em cinco dias quando mantidos em temperatura de 26 °C. Cada fêmea produz, em média, 300 ovos durante a desova, sendo cerca de 70% a 90% de ovos viáveis. Após a desova, os reprodutores podem comer seus próprios ovos e, por esse motivo, deve-se utilizar uma câmara de desova com malha de aproximadamente 3 mm para permitir a passagem dos ovos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Apresenta os estádios de desenvolvimento larval, juvenil e adulto. Seu estágio larval inicia-se logo após a eclosão do ovo, que ocorre entre 48 e 72 horas após a fertilização. De 24 a 48 horas após a eclosão as larvas inflam suas bexigas natatórias, e 5 dias pós-fertilização, cérebro, coração, fígado, pâncreas e outros órgãos já estão desenvolvidos (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ *et al.*, 2008).

As fases de desenvolvimento iniciais dos peixes são estádios bastante sensíveis do seu ciclo de vida, pois ocorrem diversas etapas críticas e essenciais em um curto espaço de tempo. Caso durante a fase inicial de desenvolvimento haja um estresse ambiental originado por um poluente, alterações no desenvolvimento podem ocorrer, e a sobrevivência é imediatamente reduzida (LAWRENCE, 2007).

O crescimento da popularidade do peixe-zebra como modelo experimental está relacionado à sua alta taxa de fecundidade, tamanho pequeno, ciclo reprodutivo curto, produção de grande número de embriões, transparência dos ovos e larvas (que permite o acompanhamento do desenvolvimento do peixe e observação da presença de malformações), desenvolvimento externo (que possibilita a utilização de procedimentos não invasivos que minimizam o sofrimento e estresse do animal) e similaridade genética aos humanos (70%), que oferece uma posição privilegiada desse organismo-teste na avaliação genética e toxicológica (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ *et al.*, 2008).

3.3.3 Ensaio FET

Por razões éticas, os testes com embriões de peixe-zebra têm sido propostos como uma alternativa para a substituição dos experimentos com animais adultos, pois os embriões apresentam sensibilidade a diversos tipos de contaminantes, baixo custo

e facilidade de manutenção e, não são regulados pela legislação europeia (SCHOLZ *et al.*, 2008).

O ensaio FET de 48 h com embriões de *D. rerio* foi desenvolvido pela *Deutsches Institut Für Normung* (DIN) em 2001, como proposta de método alternativo ao uso de peixes adultos em ensaios agudos para avaliação ecotoxicológica de efluentes (BRAUNBECK *et al.*, 2005). Na Alemanha, o FET é utilizado em ensaios de rotina exigidos pela Agência Ambiental e foi padronizado internacionalmente (DIN 38415-6, 2001) (DIN, 2001). Na Europa, devido à crescente preocupação ética a respeito do uso de vertebrados em ensaios ecotoxicológicos, o desenvolvimento de métodos alternativos é recomendado por agências como REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) e *European Cosmetics Directive*. Assim, o FET de 96 h foi aprovado pela OCDE e padronizado em 2013 para avaliação de toxicidade aguda de substâncias químicas (OCDE, 2013).

São encontrados na literatura muitos trabalhos que avaliam a toxicidade de substâncias químicas ao estágio embrionário do peixe-zebra, em menor quantidade, estudos que avaliam os efeitos agudos de esgotos a esse estágio de desenvolvimento.

O potencial tóxico dos esgotos bruto e tratado de uma ETE na cidade de Virovitica, na Croácia, que emprega um tratamento biológico aeróbio pelo processo de lodos ativados, foi avaliado para embriões de *D. rerio* usando um conjunto de biomarcadores. Os embriões expostos exibiram uma série de efeitos tóxicos, incluindo mortalidade, anomalias no desenvolvimento e alterações na frequência cardíaca. Apesar de o efluente da ETE ainda apresentar toxicidade ao organismo-teste, os autores identificaram eficiência na remoção de toxicidade no tratamento. A mortalidade dos embriões após 24 h de exposição, foi de 22,2% no esgoto bruto e 14,29% no esgoto tratado. Após 48 h, a mortalidade foi de aproximadamente 67% e 24%, nos esgotos bruto e tratado, respectivamente (BABIĆ *et al.*, 2017).

Efluentes de caixas separadoras de água e óleo de postos de combustíveis da cidade de Recife/PE se mostraram teratogênicos para os embriões do peixe-zebra, causando patologias como cardiotoxicidade, ausência de bexiga natatória, edema pericárdico, hemorragia e malformação da boca. A CL(I)₅₀ atingiu 8,9% nos efluentes mais tóxicos. Essa toxicidade foi relacionada pelos autores aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos derivados do petróleo que estavam

presentes em concentração de 11 μg equivalentes de fenantreno L^{-1} (ALVES *et al.*, 2017).

Silva *et al.* (2019) ao avaliarem os efeitos de hormônios esteroides livres (progesterona e 17β -estradiol) e complexados em ciclodextrina, identificaram que os hormônios livres causaram maior percentual de teratogenicidade com efeito agudo aos embriões de *D. rerio*. Os organismos expostos ao E2 livre, após 96 h, apresentaram deformação da coluna em concentrações de 10 ng.L^{-1} ; em 30 ng.L^{-1} , notaram edema de saco vitelínico e edema de pericárdio.

Visto que há um crescente interesse no peixe-zebra como modelo de pesquisa ecotoxicológica e os testes com os embriões representam um modelo com extensa gama de aplicações nas ciências ambientais, é indiscutível que esses organismos devam ser cada vez mais estudados. Pesquisas envolvendo esse organismo irão contribuir, sempre que possível, para a substituição dos experimentos com animais adultos.

3.3.4 Ensaio YES

O ensaio YES, desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de mimetizar a atividade do estrogênio pela interação com o Receptor de Estrogênio Humano (REh). Ao se comparar a atividade estrogênica de uma determinada amostra à do estrogênio, é possível quantificar essa atividade em equivalentes de 17β -estradiol.

O ensaio é realizado a partir de uma linhagem modificada da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que contém um REh. Em contato com compostos que possuem atividade estrogênica o REh é capaz de produzir a enzima β -galactosidase, que metaboliza o substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) presente no meio, formando lactose e vermelho de clorofenol, o que promove a alteração da cor amarela para vermelha (Figura 4). A produção de β -galactosidase no meio depende da quantidade de substância estrogênica. A medida da absorvância pela espectrofotometria permite estimar a quantidade de substância estrogênica no meio de análise. O resultado é expresso em equivalentes de 17β -estradiol.

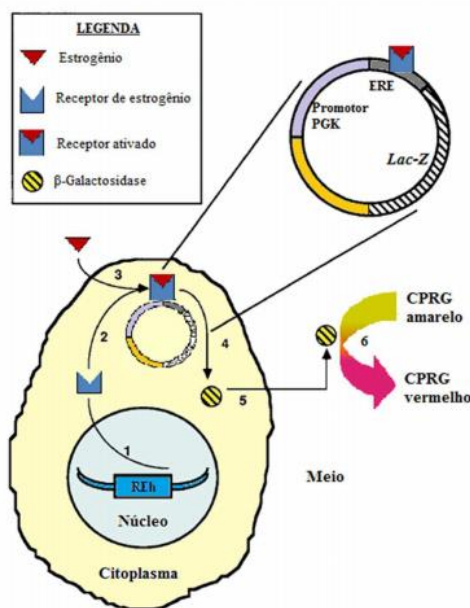


Figura 4 – Esquema do processo de expressão da enzima β -galactosidase
 Fonte: Adaptado de Routledge e Sumpter (1996).

Amostras de esgoto bruto em estudo realizado por Leusch e colaboradores (2006) na Nova Zelândia apresentaram atividade estrogênica entre 4 e 185 ng EQ-E2.L⁻¹. Por análise em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, algumas substâncias químicas estrogênicas foram quantificadas e, ao comparar os resultados, os hormônios naturais E1 e E2 representaram a maior parte da atividade estrogênica no esgoto bruto (62%), com concentrações entre 8 e 23 ng.L⁻¹ para E2 e 20 a 617 ng.L⁻¹ para E1. Após o tratamento biológico aeróbio, a contribuição dos hormônios E1 e E2 foi reduzida para 11%, com atividade estrogênica entre 1 e 4,2 EQ-E2.L⁻¹.

3.3.5 Vitelogenina (VTG) – função e quantificação

A vitelogenina é normalmente produzida pelo fígado de vertebrados ovíparos femininos em resposta a estrogênio endógeno circulante. É uma precursora de proteínas da gema de ovo e, uma vez produzida no fígado, viaja na corrente sanguínea para o ovário. A VTG é quase indetectável no plasma de peixes imaturos porque eles não têm estrogênio circulante suficiente; no entanto, o fígado é capaz de sintetizar e secretar a VTG em resposta a estimulação exógena de estrogênio (OCDE, 2012).

Embora a síntese de VTG nas fêmeas seja um fenômeno fisiológico, sua síntese pode ser induzida de forma não fisiológica no fígado de machos expostos a substâncias químicas com várias formas de ação estrogênica. Portanto, a indução de VTG em machos serve como um biomarcador sensível e específico de exposição estrogênica (SEGNER, 2009). As técnicas mais comuns para quantificar VTG em peixe-zebra são RT-PCR e ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). O ELISA é um ensaio de imunoabsorção enzimática, técnica que utiliza o princípio da interação antígeno-anticorpo com marcadores enzimáticos (Figura 5). É utilizado para avaliar a exposição estrogênica em ambientes aquáticos e se apresenta como uma ferramenta apropriada para determinar os efeitos endócrinos em peixes (OCDE, 2012).

O pequeno tamanho do peixe-zebra dificulta a amostragem de sangue, mesmo em peixes adultos. Dessa forma, para quantificar os níveis de VTG pelo ELISA são comumente utilizados homogeneizados de todo o corpo do animal.

A técnica consiste no uso do sobrenadante de homogeneizados de peixes, após centrifugação, em microplacas de 96 poços. Nos poços ocorrem as reações de interação anticorpo-antígeno sob condições adequadas de temperatura e de meio reacional. Essas interações são detectadas mediante a reação com um substrato cromógeno, cujo desenvolvimento de cor é medido por um espectrofotômetro a 492 nm. A intensidade de cor está relacionada à interação anticorpo-antígeno e, por sua vez, à concentração de VTG, mediante comparação com uma curva padrão (OCDE, 2012).

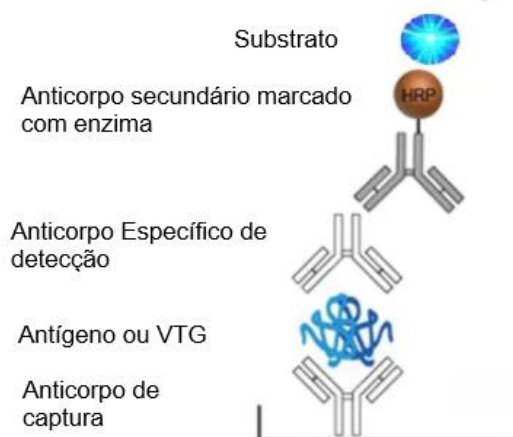


Figura 5 – Esquema do ELISA sanduíche
Fonte: adaptado de LifeSpan BioSciences (2019).

Brion *et al.* (2004) realizaram um estudo com o objetivo de investigar o estágio de vida mais sensível do peixe-zebra ao 17β -estradiol na indução de vitelogenina, no desenvolvimento gonadal e na reprodução. Os organismos foram expostos durante 3 semanas a concentrações de 5, 25 e 100 ng.L^{-1} em estádios embrionarval (desde a fertilização até 21 dias pós-fertilização (dpf)), juvenil (21 a 42 dpf) e no estágio de vida adulta (>200 dpf). O trabalho demonstrou que exposições a baixas concentrações de E2 resultaram em indução de VTG em todos os estádios de vida do peixe-zebra; no entanto, os efeitos foram reversíveis após depuração. A concentração efetiva de E2 para indução de VTG no estágio inicial de vida do peixe-zebra foi de 100 ng.L^{-1} enquanto no peixe macho adulto foi entre 5 e 25 ng.L^{-1} . A exposição ao E2 resultou em modificação da característica sexual secundária em machos e na produção de ovos. Esse estudo demonstrou que os estádios iniciais de vida do peixe-zebra são sensíveis a baixas concentrações de E2, levando a feminização parcial da população e à indução de VTG. Os dados apresentados levantaram maiores preocupações sobre os efeitos de hormônios no meio ambiente e na saúde reprodutiva do peixe.

A redução e o aumento da fecundidade podem ser associados, respectivamente, com a exposição a baixas e altas concentrações de compostos estrogênicos, como evidenciado em medaka japonês exposto a EE2 por 14 dias, em que a fecundidade foi inibida a 500 ng.L^{-1} e induzida a 0,2 ng.L^{-1} (TILTON; FORAN; BENSON, 2005). Em peixes *Oryzias melastigma*, águas estuarinas poluídas por esgotos e com baixas concentrações de compostos estrogênicos induziram a desova dos grupos em exposição de 21 dias (CHEN *et al.*, 2016). Em *D. rerio*, o esgoto municipal tratado reduziu a produção de ovos nos aquários expostos a 50% da amostra, no período de 7 dias, comparados ao controle (LISTER *et al.*, 2009). Exposição a EE2 também induziu respostas reprodutivas em *Pimephales promelas* (peixe-boi de cabeça chata) estimulando a produção de ovos em doses de até 1 ng.L^{-1} e efeitos inibitórios em concentrações mais elevadas (JOBILING *et al.*, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Plano experimental

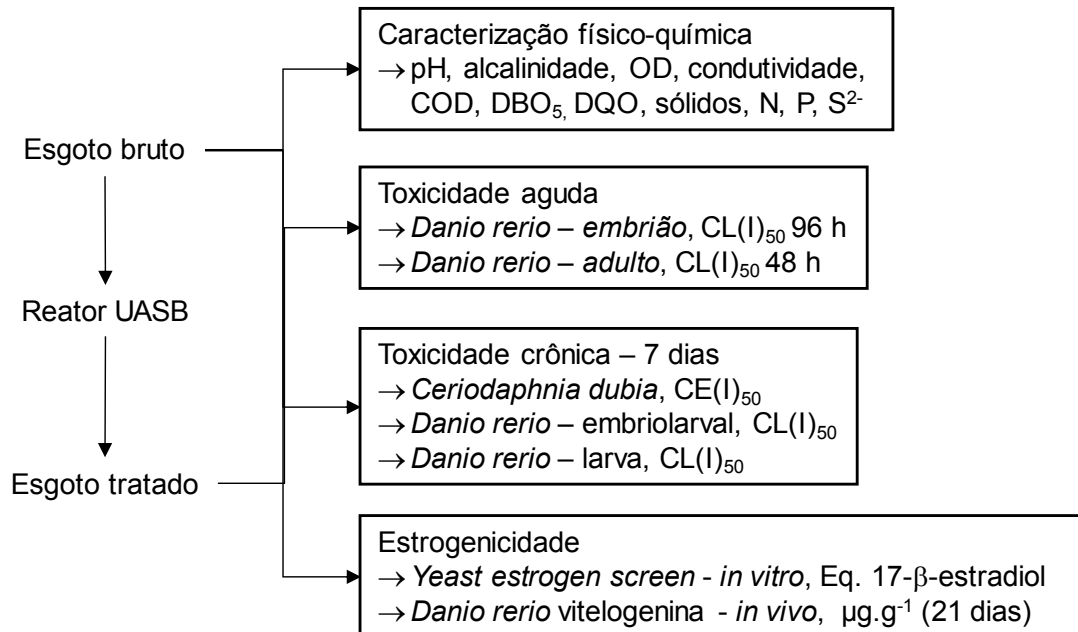


Figura 6 – Fluxograma das diferentes atividades realizadas neste trabalho.

O ensaio de toxicidade aguda com o peixe adulto foi realizado somente com o esgoto tratado com o propósito de se estabelecer uma concentração máxima para o ensaio crônico para análise de VTG.

4.2 Esgotos

O esgoto bruto foi coletado uma única vez no bairro Vale do Sol, ao final da rede de esgotamento sanitário do município de Viçosa (população estimada 78.846; IBGE, 2019) e encaminhado para o Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA) do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa. O esgoto foi deixado em repouso por duas horas para sedimentação dos sólidos em suspensão de maior densidade. Após esse período, o sobrenadante foi sifonado para frascos de um litro e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para os bioensaios e armazenado sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o abastecimento do reator.

O esgoto tratado foi coletado na saída de um reator UASB em escala de bancada com volume útil de três litros, operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 9h, em temperatura média de $34\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o reator atingir estabilidade, com

teores de sólidos suspensos e DQO do esgoto tratado não variando em mais de 10% em cinco medições sucessivas, aproximadamente 40 litros foram coletados durante 5 dias de operação, fracionados em frascos de 1 litro e armazenados a -20° C para posterior caracterização ecotoxicológica.

Na Figura A-1 (APÊNDICE A) é apresentada a ilustração esquemática do reator UASB e os esgotos antes e após tratamento.

4.3 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química dos esgotos bruto e tratado foi realizada imediatamente após sua coleta pela quantificação dos parâmetros apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos analisados para a caracterização dos esgotos bruto e tratado

Parâmetro	Método (SMEWW) ^a
pH	4500-H ⁺ B
Oxigênio Dissolvido (OD)	4500-O G
Condutividade Elétrica (CE)	2510
Carbono Orgânico Dissolvido (COD)	5310 B
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅)	5210 B
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	5220 D
Sólidos Totais (ST), Fixos (STF) e Voláteis (STV)	2540 B e 2540 E
Sólidos Suspensos Totais (SST), Fixos (SSF) e Voláteis (SSV)	2540 D e 2540 E
Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT)	4500-N _{org} B
Nitrogênio Amoniacal (N-NH ₃)	4500-NH ₃ C
Sulfeto Solúvel (S ²⁻)	4500-S ²⁻ F
Fósforo (P)	4500-P D
Alcalinidade	2320 B

^a SMEWW – Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

Os parâmetros pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram quantificados simultaneamente com o multiparâmetro da marca *Hach*, modelo HQ40d.

As análises de carbono orgânico dissolvido foram realizadas no analisador da marca *Shimadzu*, modelo TOC-V_{CSH}. As amostras foram previamente filtradas em membranas de 0,45 µm (Unifil – 510.047).

Para analisar sólidos suspensos totais, utilizou-se filtro de fibra de vidro de porosidade 1,2 µm (HNM – GF52/C).

As análises dos parâmetros colorimétricos (DQO e P) foram executadas no espectrofotômetro *Hach* modelo DR3800. A digestão das amostras para análise de DQO foram realizadas no reator digital *Hach* DRB200.

4.4 Seleção e manutenção dos peixes

Exemplares do peixe-zebra para uso em reprodução foram obtidos na piscicultura Santinha Peixes Ornamentais LTDA-ME, localizada no município de Vieiras-MG. Os organismos utilizados nos ensaios para avaliação de estroginicidade e no ensaio agudo com peixe adulto foram obtidos da piscicultura Lindóia Peixes (Nilo Teodoro Cerqueira Junior) localizada na cidade de Muriaé-MG.

Foram selecionados organismos jovens, em idade de reprodução, com ausência de sinais de doença (pele, morfologia externa e comportamento).

As atividades desenvolvidas nesta pesquisa foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA) pelo protocolo 08/2018 (ANEXO A).

4.4.1 Cultivo dos peixes

Os peixes utilizados para a reprodução e obtenção de ovos e larvas foram mantidos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LabNut) do Departamento de Zootecnia (DZO) da UFV.

As dimensões dos quatro aquários utilizados foram de 30 x 20 x 25 cm, cada um contendo treze litros de água de abastecimento desclorada (Figura 7). A água era deixada em repouso por pelo menos 24 h para garantir a ausência de cloro residual. A temperatura foi mantida com o uso de termostatos, em 26 ± 2 °C, o fotoperíodo foi de 12 h luz/12 h escuro com iluminância média de 550 lux com o uso de lâmpadas fluorescentes brancas.

Machos e fêmeas foram cultivados em aquários distintos, respeitando a proporção de 1 litro de água por grama de peixe. Cada aquário continha uma bomba de circulação interna que assegurava a manutenção de oxigênio dissolvido acima de 5 mg.L^{-1} (ABNT NBR 15499, 2016). Uma vez por semana foi realizada a limpeza dos aquários e a renovação de 25% da água. A alimentação foi realizada *ad libitum*, duas vezes ao dia com a ração Alcon Basic (Alcon-Brasil) para peixes ornamentais.

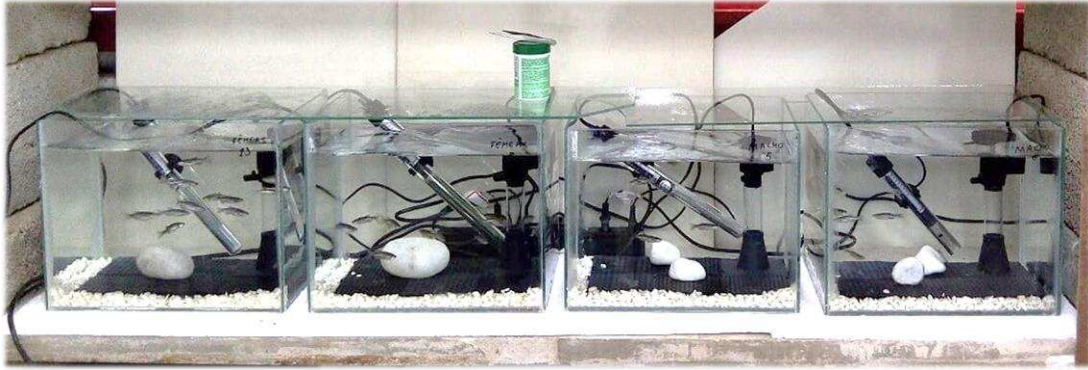


Figura 7 – Aquários de cultivo do peixe-zebra.

4.4.2 Reprodução e coleta dos ovos

Os ovos e as larvas utilizadas nos ensaios foram obtidos a partir de três aquários de reprodução, com dimensões de 40 x 20 x 20 cm (Figura 8).

Para impedir a predação dos ovos pelos peixes, foi fixada em cada aquário uma criadeira com tela de diâmetro igual a 2,5 mm, o suficiente para a passagem dos ovos sem danificá-los. Ao fixar a criadeira nas paredes dos aquários, foi observada uma distância máxima de 3 cm do fundo, com o propósito de se evitar uma coluna d'água muito alta que dificultasse a fecundação dos ovos no fundo do aquário, conforme recomendado pela norma brasileira (ABNT NBR 15499, 2016).



Figura 8 – Aquários de reprodução com as criadeiras fixadas nas paredes laterais.

A reprodução foi preparada em intervalos de 15 dias. Foi utilizada água de abastecimento desclorada nos aquários de reprodução; cada aquário continha aproximadamente 12 litros de água, um termostato a 26 °C e pedra porosa ligada a um compressor de ar para garantir a oxigenação.

Algumas horas antes do início do período de escuridão, foram dispostos, em cada aquário, três peixes em idade de reprodução, dois machos e uma fêmea. No dia seguinte, o acasalamento, a desova e a fertilização ocorriam dentro de 30 minutos após o início do período de luz. Logo em seguida, para evitar tendência genética, os ovos dos três aquários foram coletados, misturados, lavados cuidadosamente e distribuídos em placas de *Petri*.

Com o auxílio de um microscópio, os ovos foram diferenciados entre fertilizados e não fertilizados. Parte dos ovos fertilizados foi utilizada para o ensaio com embriões. Os ovos restantes foram colocados em incubadora com fotoperíodo para posterior montagem do ensaio com larvas (Figura 9). A água nas placas de *Petri* foi renovada diariamente, e os ovos não viáveis foram removidos e descartados. Os testes foram montados aproximadamente três dias após a desova, logo após a eclosão das larvas.

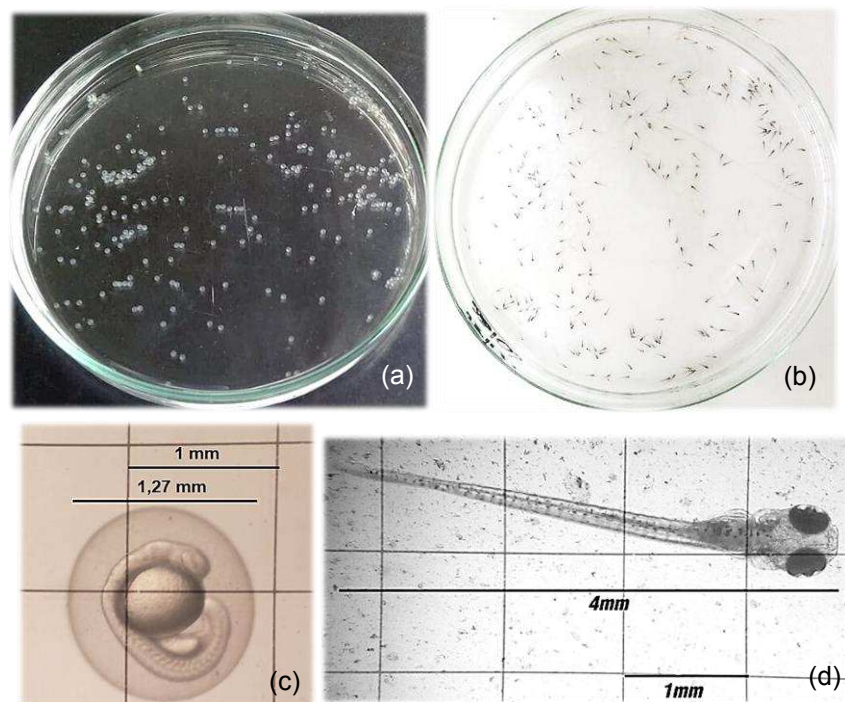


Figura 9 – (a) ovos fertilizados, (b) larvas recém eclodidas, (c) ovo visto pelo microscópio com ampliação de 40x. (d) larva vista pelo microscópio com ampliação de 40x.

4.5 Ensaios de sensibilidade

Em paralelo aos ensaios de toxicidade, foram realizados testes com uma substância de referência, conforme preconizado em cada norma. A substância utilizada para todos os organismos foi o cloreto de sódio. A água utilizada para o

cultivo dos organismos (*C. dubia*, ovos e larvas de *D. rerio*), bem como para o preparo das diluições, foi coletada periodicamente após os processos de coagulação e filtração na Estação de Tratamento de Água (ETA) da UFV, com correção de dureza para 44 mg.L⁻¹ de CaCO₃, como recomendado pela NBR 15499 (ABNT, 2016).

As concentrações de NaCl utilizadas para *C. dubia* foram 0; 0,188; 0,375; 0,75; 1,5 e 3 g.L⁻¹. Para os ovos e larvas de *D. rerio* as concentrações foram 1, 2, 4, 8 e 16 g.L⁻¹.

4.6 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda das amostras foi avaliada com embriões do peixe *D. rerio* obtidos a partir das etapas de reprodução e coleta de ovos. Foram realizadas três réplicas para cada amostra (esgotos bruto e tratado). Também foi avaliada a toxicidade aguda (sem réplica) do esgoto tratado aos peixes adultos. Os resultados foram expressos como concentração letal mediana (CL₅₀) e classificados usando uma escala relativa de toxicidade adaptada de Bulich (1982) (Tabela 2).

Tabela 2 – Sistema de classificação da toxicidade aguda (Bulich, 1982)

CL ₅₀ (% v/v)	Classificação
< 25	Extremamente tóxico
25 – 50	Altamente tóxico
51 – 75	Moderadamente tóxico
> 75	Levemente tóxico

4.6.1 Embriões

Os ensaios com embriões foram realizados de acordo com teste FET (OCDE, 2013), em que ovos recém fertilizados foram expostos a diluições seriadas do efluente por um período de 96 h.

No dia anterior ao ensaio, ao final do dia, placas estéreis de poliestireno de 24 poços foram condicionadas com as soluções-teste (diluições seriadas dos esgotos bruto e tratado). Cada placa conteve 20 réplicas com 2,5 mL de solução-teste por poço e os 4 poços restantes foram dedicados a um controle negativo interno. As diluições empregadas foram de 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100% de amostra em água de cultivo.

Para cada teste foram utilizadas sete placas, sendo que cinco contiveram as diluições das amostras, uma placa foi utilizada para o controle negativo (água de cultivo) e uma placa para o controle positivo (3,4-dicloroanilina a 4 mg.L⁻¹), como preconizado pela norma da OCDE.

No dia seguinte, logo após a reprodução e coleta dos ovos, foi adicionado um ovo recém fertilizado (< 60 min) em cada poço das sete placas do ensaio. Posteriormente, as placas foram tampadas e mantidas em incubadora com temperatura de 26±1 °C, fotoperíodo de 12 h com luz difusa/12 h escuro e iluminância média de 700 lux com o uso de lâmpadas fluorescentes de cor branca. A representação do ensaio pode ser vista na Figura 10.

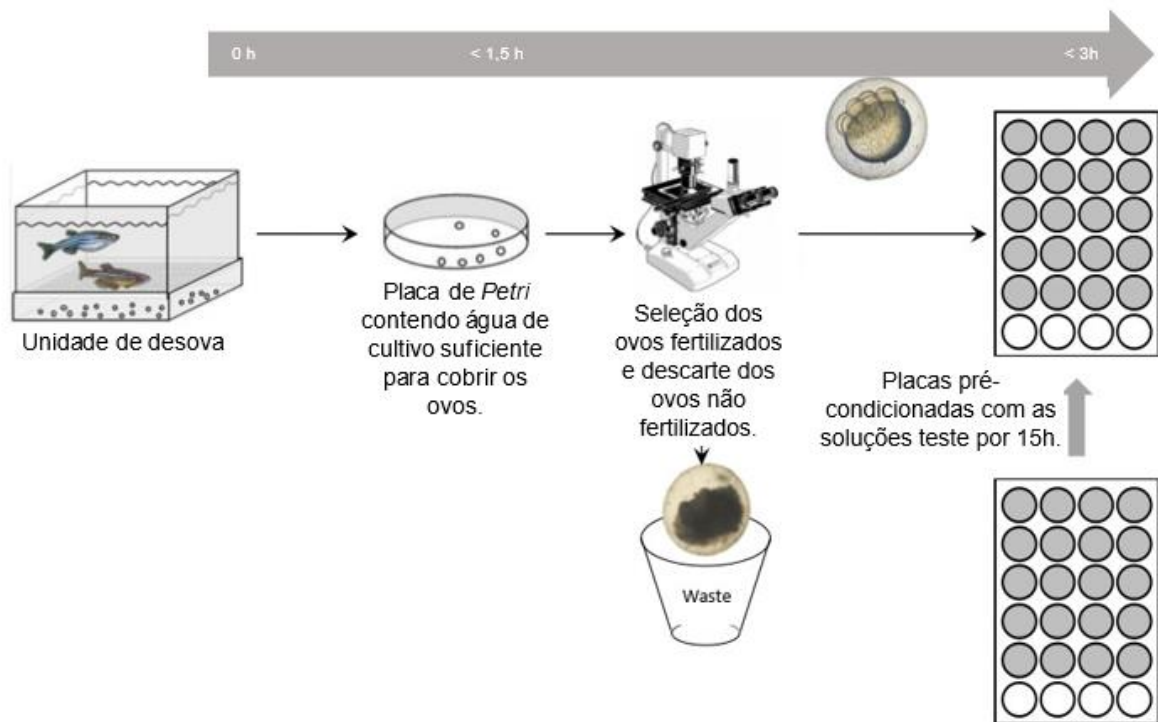


Figura 10 – Esquema de ensaio com os ovos do peixe *Danio rerio*.
Fonte: adaptado de OCDE 236 (2013).

A cada 24 h, com o uso de um microscópio (ampliação de 40x), todos os embriões foram observados e registraram-se quatro indicadores de letalidade: coagulação dos ovos fertilizados, falta de formação do somito, falta de desprendimento da cauda do saco vitelínico e ausência de batimento cardíaco, ilustrados na Figura 11 e descritos a seguir.

- *Embrião coagulado*: os embriões coagulados são branco-leitosos e aparecem escuros quando vistos ao microscópio;
- *Ausência de somito*: após 24 h e em temperaturas de 26 ± 1 °C, cerca de 20 somitos já se formaram em embriões do peixe-zebra com desenvolvimento normal. Além disso, movimentos espontâneos podem ser observados em um embrião com somitos desenvolvidos;
- *Destacamento da cauda*: em um embrião normalmente desenvolvido, a cauda se desprende por completo do saco vitelínico a partir das primeiras 24 h de vida;
- *Ausência de batimento cardíaco*: o batimento cardíaco no embrião é facilmente observado após 48 h, batimentos cardíacos irregulares não foram registrados como letais.

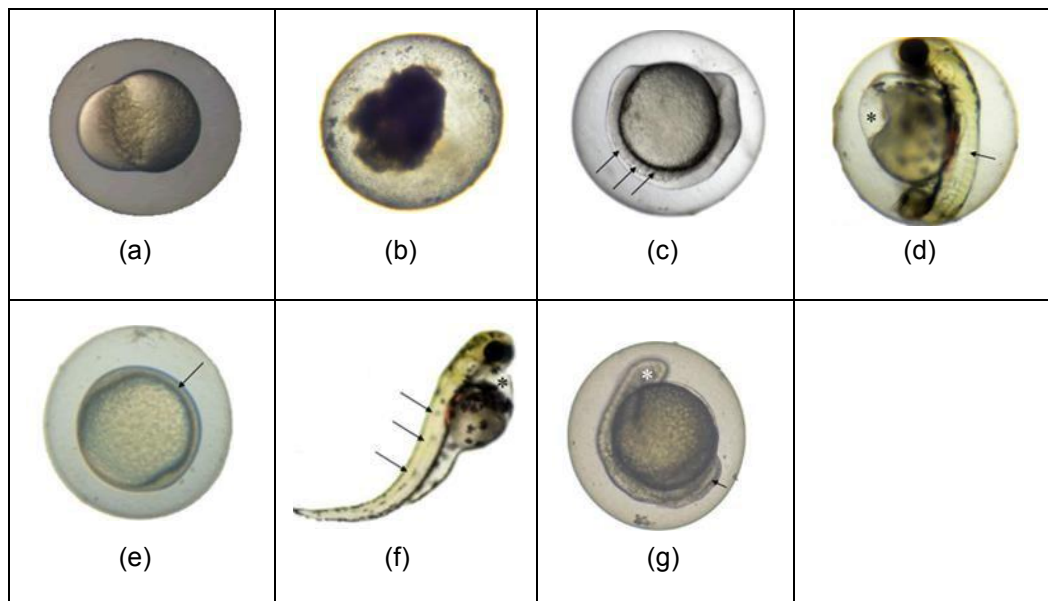


Figura 11 – Indicadores de letalidade para os embriões do peixe *Danio rerio*. (a): ovo fertilizado, (b) ovo coagulado, (c) e (d) formação do somito. (e) e (f) não formação do somito. (g) não desprendimento da cauda do saco vitelínico. Fonte: OCDE (2013).

Ao final do tempo de exposição, os resultados de sobrevivência (observação de um ou mais dos indicadores) nas amostras foram comparados com o controle para a obtenção da $CL(I)_{50}$, juntamente do intervalo de confiança. Para tanto, foi empregado o método estatístico não paramétrico de Spearman-Kärber a partir do software CETIS

(*Comprehensive Environmental Toxicity Information System™*, Tidepool Scientific, McKinleyville, CA, EUA).

4.6.2 Peixe adulto

O ensaio de toxicidade aguda com o peixe-zebra foi conduzido conforme a norma brasileira (ABNT NBR 15088, 2016), em que peixes da espécie *D. rerio* foram expostos às diluições da amostra por um período de 48 h em regime estático. O efeito observado foi a letalidade, comparada ao controle, sob as mesmas condições do ensaio.

Seis aquários, cada um contendo cinco machos e cinco fêmeas, foram utilizados no ensaio, sendo um para o controle e cinco para as diluições da amostra. Cada aquário continha cinco litros de solução-teste, com diluições compreendidas entre 6,25 a 100% e fator de espaçamento igual a 2.

A temperatura das soluções-teste foi mantida com o uso de termostatos regulados a 26 °C, o oxigênio dissolvido foi assegurado acima de 5 mg.L⁻¹ com o uso de compressores de ar e pedras porosas, e os organismos não foram alimentados durante o período do ensaio. O fotoperíodo foi de 12 h luz/12 h escuro e iluminância média de 500 lux com o uso de lâmpadas fluorescentes brancas.

Ao final do tempo de exposição, os resultados de sobrevivência nas amostras foram comparados com o controle para a obtenção da CL(I)₅₀ e do intervalo de confiança com o emprego do método estatístico *de* Spearman-Kärber, a partir do software CETIS.

4.7 Toxicidade crônica

A toxicidade crônica das amostras foi avaliada com três organismos-teste de água doce: o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e embriões e larvas do peixe *Danio rerio*. Para cada organismo foram efetuadas, em dias distintos, três repetições de cada ensaio.

Do mesmo modo que no ensaio agudo, os resultados de toxicidade crônica foram classificados usando a escala de toxicidade relativa adaptada de Bulich (1982), e utilizado de forma similar por Düpont e Lobo (2012).

4.7.1 *Ceriodaphnia dubia*

O ensaio com a *C. dubia* foi executado de acordo com a norma brasileira (ABNT NBR 13373, 2017). O teste foi conduzido de forma semiestática, com renovação das soluções-teste a cada 48 h, e duração de 7 dias. As diluições empregadas foram de 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100% de amostra em água de cultivo.

Cada teste continha 10 réplicas com 15 mL das soluções-teste e um neonato de 6 a 24 h de vida. Os ensaios foram mantidos em incubadora com temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h com luz difusa/12 h escuro e iluminância média de 700 lux com o uso de lâmpadas fluorescentes de cor branca. A alimentação dos organismos foi realizada diariamente com uma suspensão algácea da microalga *Raphidocelis subcapitata* (2×10^5 células/organismo) e nos momentos das trocas dos meios, com uma ração para peixe solubilizada (10 μL /organismo), preparada a partir da ração TetraMin Plus (Tetra, Spectrum Brands, Alemanha).

Os adultos sobreviventes e os neonatos produzidos foram quantificados a cada renovação do meio e ao final do tempo de exposição. Os resultados de sobrevivência e reprodução nas amostras foram comparados com o controle para a obtenção da $\text{CL}(I)_{50}$, concentração em que se observa efeito de mortalidade em 50% dos organismos, ou $\text{CE}_{50}(I)$, concentração que afeta a capacidade de reprodução em 50% dos organismos, juntamente do intervalo de confiança. Para isso, foram empregados os métodos de Spearman-Kärber e interpolação linear com o uso do software CETIS.

4.7.2 Embriões - toxicidade crônica de curta duração

Para a avaliação da toxicidade crônica de curta duração com os embriões do peixe, foram utilizados os mesmos ensaios descritos anteriormente para toxicidade aguda. Ao final do tempo de duração do ensaio agudo (96 h), os testes, bem como as observações diárias dos indicadores de letalidade, foram estendidos para 168 h.

4.7.3 Larvas

Para o ensaio com as larvas do peixe *D. rerio*, foi utilizado o método de toxicidade crônica de curta duração (ABNT NBR 15499, 2016). Larvas recém eclodidas foram expostas a diluições seriadas das amostras durante 168 h em regime semiestático.

As diluições utilizadas nos ensaios foram de 0,9%, 1,8%, 3,5%, 7% e 14% das amostras filtradas em membranas de 0,22 µm e diluídas em água de cultivo. Os organismos–teste foram incubados em diluições seriadas dos esgotos a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro e luminância média de 700 lux com o uso de lâmpadas fluorescentes brancas. Cada teste continha 4 réplicas com 250 mL e 10 larvas eclodidas a menos de 24 h. Foram realizadas duas trocas das soluções–teste durante o período do ensaio, e os organismos não foram alimentados, conforme preconizado na norma.

Após o período de exposição, foi calculada, com o emprego do *software* CETIS, a $CL(I)_{50}$ e a $CL(I)_{15}$, ambas por meio do método de interpolação linear. Por último, o valor crônico estimado (VCest) foi obtido pela multiplicação do valor da $CL(I)_{15}$ pelo fator 0,3, com o objetivo de gerar valores equivalentes aos ensaios crônicos de duração iguais ou superiores a 28 dias com *Pimephales promelas* (BERTOLETTI, 2009).

4.8 Atividade estrogênica

4.8.1 Ensaio YES

A atividade estrogênica nas amostras de esgotos bruto e tratado foi determinada pelo ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*), de acordo com a metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996), com modificações. As análises foram realizadas no LESA-UFV.

Uma alíquota da cepa da levedura *S. cerevisiae* geneticamente modificada por J. P. Sumpter da Universidade de Brunel, Uxbrige, Reino Unido, foi cedida pela D. Sc. Daniele Maia Bila, professora do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ) e cultivada no LESA.

Os micropoluentes apolares presentes nas amostras foram concentrados em cartuchos C₁₈ de 500 mg com capacidade de 6 mL (*Agela Technologies e Applied Separations*), pela técnica de extração em fase sólida – EFS, após ajuste do pH das amostras para 3 com HCl. Os cartuchos foram previamente condicionados segundo Bila *et al.* (2007), passando-se 3 x 2 mL de hexano, 1 x 2 mL de acetona, 2 x 3 mL de metanol e, por último, lavados com 5 x 2 mL de água purificada (Sistema Osmose

Reversa, Gehaka Linha LXE) com pH ajustado para 3. Foi feita uma filtração prévia das amostras em membranas de 0,45 μm e, portanto, os contaminantes ligados a partículas não são considerados no presente trabalho.

A extração foi realizada por gotejamento contínuo, em velocidade aproximada de 2 mL.min⁻¹, mantendo sempre uma película do líquido acima da fase sólida do cartucho a fim de evitar o ressecamento dos poros e consequente perda do analito. Após a extração, o extrato foi eluído passando-se 4 x 1 mL de acetona através do cartucho e coletando-a em tubos de ensaio (Figura 12). A acetona foi totalmente volatilizada em duas etapas: temperatura ambiente e fluxo de nitrogênio gasoso; em seguida, os tubos de ensaio foram congelados a -20°C. No momento da realização do ensaio YES, os analitos foram reconstituídos em 1 mL de etanol grau HPLC.

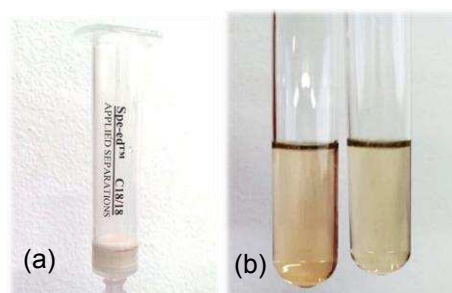


Figura 12 – Amostras após etapa de extração em fase sólida. (a) cartucho, (b) extratos eluídos em acetona, esgoto bruto (esquerda) e tratado (direita).

O ensaio foi realizado em capela de fluxo laminar, em microplacas estéreis de 96 poços, com fundo chato e tampa. Inicialmente, foram preparadas, também em microplacas de 96 poços, 12 diluições seriadas 1:1 das amostras reconstituídas e da curva padrão, ambas em etanol absoluto (Figura 13). A curva foi feita a partir de uma solução-padrão de 17 β -estradiol (54,48 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

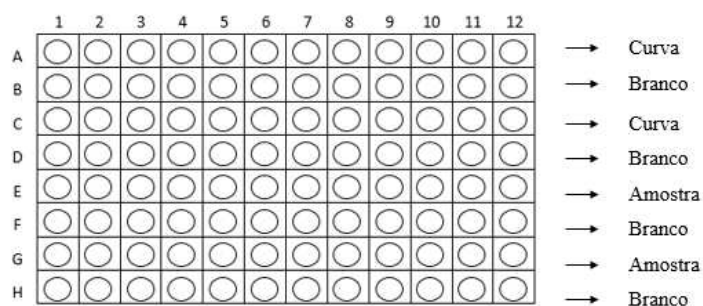


Figura 13 – Esquema da distribuição das curvas e amostras nas placas de 96 poços para o ensaio YES.

Após o preparo das diluições, 10 µL dos extratos diluídos foram transferidos em duplicata para cada poço correspondente da placa de análise, intercalados com controles negativos. Após a evaporação completa dessa alíquota, restando apenas a massa das mesmas, adicionaram-se 200 µL do meio de análise contendo meio de cultivo, CPRG (80 mg.L⁻¹) e levedura com absorbância a 620 nm igual a 1 (aproximadamente 4 x 10⁷ células). As concentrações finais nos poços da curva foram de 1,3 a 2.724 ng.L⁻¹ de 17β-estradiol.

As placas foram fechadas, suas laterais envolvidas com fita crepe, agitadas por 2 minutos em agitador de placas de 96 poços (KASVI-K40 10208) e incubadas em estufa aquecida a 30 °C por um período de 7 dias. Ao final do tempo de incubação, as placas foram novamente agitadas e deixadas em repouso por 1 h, até o momento da leitura (Figura 14). A leitura das absorbâncias foi feita em leitora de microplacas (Celer® Polaris, Belo Horizonte) nos comprimentos de onda de 540 nm para a produção de cor pela produção de β-galactosidase, e 630 nm para turbidez, devido ao crescimento da levedura.

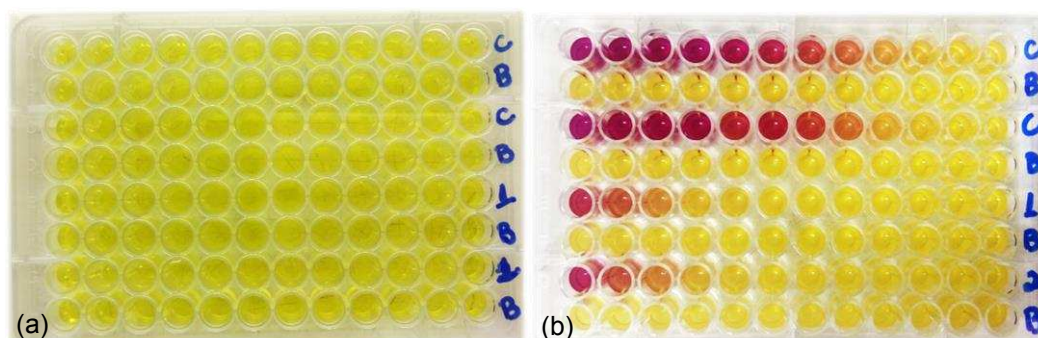


Figura 14 – Placas do ensaio YES logo após (a) preparo do teste e (b) leitura da absorbância.

Para o cálculo do equivalente de 17β-estradiol nas amostras, foi primeiro, descontada a absorbância da turbidez de cada poço da placa pela média da absorbância dos poços do branco correspondentes. Em seguida, esse valor foi subtraído da absorbância da cor de cada poço (a 540 nm), conforme a Equação 1:

$$\text{Abs corrigida Amostra} = \text{Abs}_{540 \text{ Amostra}} - (\text{Abs}_{630 \text{ Amostra}} - \text{Abs}_{630 \text{ Branco}}) \quad (\text{Equação 1})$$

A curva dose-resposta da solução-padrão de 17 β -estradiol foi construída relacionando-se os valores de absorbância corrigida em função da concentração, expresso em ng.L⁻¹, em escala logarítmica.

Os valores de CE₅₀ do 17 β -estradiol foram determinados a partir de sua curva dose-resposta juntamente dos demais parâmetros da regressão sigmoidal (Equação 2). O valor de CE₅₀ correspondeu à concentração que elucidou 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase em relação à curva padrão. Para esse cálculo utilizou-se o programa Origin 2019b (OriginLab, Northhampton, EUA).

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

Em que: y é o valor de Abs corrigida;

A₁ é a mínima indução da atividade estrogênica;

A₂ é a máxima indução da atividade estrogênica;

x é a concentração da substância estrogênica no ensaio;

x₀ é a CE₅₀ do 17 β -estradiol, e

p é a inclinação da região mediana da parte linear da curva dose-resposta.

Com os valores dos parâmetros da regressão, calculou-se o valor da atividade estrogênica (ajuste sigmoidal) em cada uma das 12 diluições na placa de teste referente à amostra pela Equação 3 (reorganizada da Equação 2):

$$x = CE_{50} \left(\frac{A_1 - A_2}{y - A_2} - 1 \right)^{\frac{1}{p}} \quad (\text{Equação 3})$$

Em seguida, pela Equação 4, calculou-se o equivalente de estradiol (EQ-E₂), no primeiro poço, considerando os volumes utilizados na extração das amostras (50 mL), na reconstituição no momento do ensaio (1 mL) e dos volumes utilizados na placa de análise (10 μ L). Nos poços subsequentes (2 a 12), a mesma equação foi utilizada, e os resultados foram multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes à diluição seriada 1:1 de cada poço.

$$EQ. E2 \left(\frac{ng}{L} \right) = x \times \frac{1 mL}{50 mL} \times \frac{200 \mu L}{10 \mu L} \quad (\text{Equação 4})$$

Na etapa seguinte, para cada amostra, um gráfico foi construído com os valores da absorbância corrigida em função das concentrações calculadas pelo ajuste sigmoidal. Por fim, calculou-se a atividade estrogênica pela média da região linear desse gráfico.

4.8.2 Ensaio de vitelogenina (VTG)

A exposição dos peixes às amostras de esgoto sanitário bruto e tratado foi realizada no LabNut. A detecção de VTG foi realizada no Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da UFV.

4.8.2.1 Ensaio

A detecção de substâncias químicas com ação estrogênica foi medida por um ensaio *in vivo* de curta duração em peixes, por meio do método ELISA, de acordo com a metodologia da OCDE (2012) modificada.

D. rerio adultos de tamanho e peso uniformes passaram por um período de adaptação de 8 dias nas mesmas condições do ensaio: fotoperíodo, alimentação, temperatura e renovação da água dos aquários. A seguir, os peixes foram expostos a três concentrações dos esgotos e ao controle (somente água desclorada) durante 21 dias. Duas réplicas, contendo cinco fêmeas e cinco machos com aproximadamente quatro meses de idade foram incluídas para cada concentração. A fecundidade (número de ovos) em cada aquário foi avaliada diariamente. Após o período de exposição, foram quantificados sobrevivência, reprodução e os níveis de vitelogenina no plasma.

4.8.2.2 Peixes

Os peixes expostos ao esgoto bruto foram recebidos da piscicultura, separados em machos e fêmeas imediatamente após a chegada e colocados para o período de adaptação.

No ensaio com o esgoto tratado, após o recebimento, os peixes foram deixados em observação durante 7 dias em um aquário a parte para melhor

diferenciação entre machos e fêmeas. Em seguida, foram colocados nos aquários de teste para início do período de adaptação.

4.8.2.3 *Água*

A água utilizada foi deixada em caixas (78 x 55 x 42 cm) por um período mínimo de 24 h para completa remoção do cloro residual. As caixas continham resistências elétricas para aquecimento da água até a temperatura de 26 °C antes da renovação das soluções-teste dos aquários.

Foram avaliados os parâmetros de pH, temperatura, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, alcalinidade, dureza (2340 C - SMEWW), nitrogênio amoniacal total, cloro residual com o uso do colorímetro AquaColor Cloro FE, marca PoliControl (método 4500-Cl⁻ G - SMEWW) e COD.

4.8.2.4 *Concentrações de ensaio*

Na escolha das concentrações a serem aplicadas do teste, foi observada a concentração máxima tolerada (CMT), determinada a partir do ensaio de toxicidade aguda com o peixe adulto exposto ao esgoto tratado. A CMT é definida como a maior concentração de teste do produto químico que resulta em menos de 10% de mortalidade (OCDE, 2012). O fator de diluição utilizado foi com espaçamento igual a 4, observando o recomendado pela norma (espaçamento entre 3,2 e 10). Além do uso da CMT, a norma também observa que a concentração máxima a ser utilizada nos ensaios requer um julgamento profissional.

4.8.2.5 *Aquários*

Os aquários utilizados neste ensaio foram confeccionados em material acrílico. A parte superior possuía formato cilíndrico com 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura. A parte inferior consistia em uma forma cônica de 10 cm em ângulo de 45° contendo um tubo de 1 cm com abertura de 0,5 cm de diâmetro para passagem da água e dos ovos (Figura 15). Ao final do tubo de saída, foi adicionada uma mangueira de silicone presa com um tubo elástico de látex para conter a água dos aquários e facilitar a retirada dos ovos e troca da água ou solução-teste.

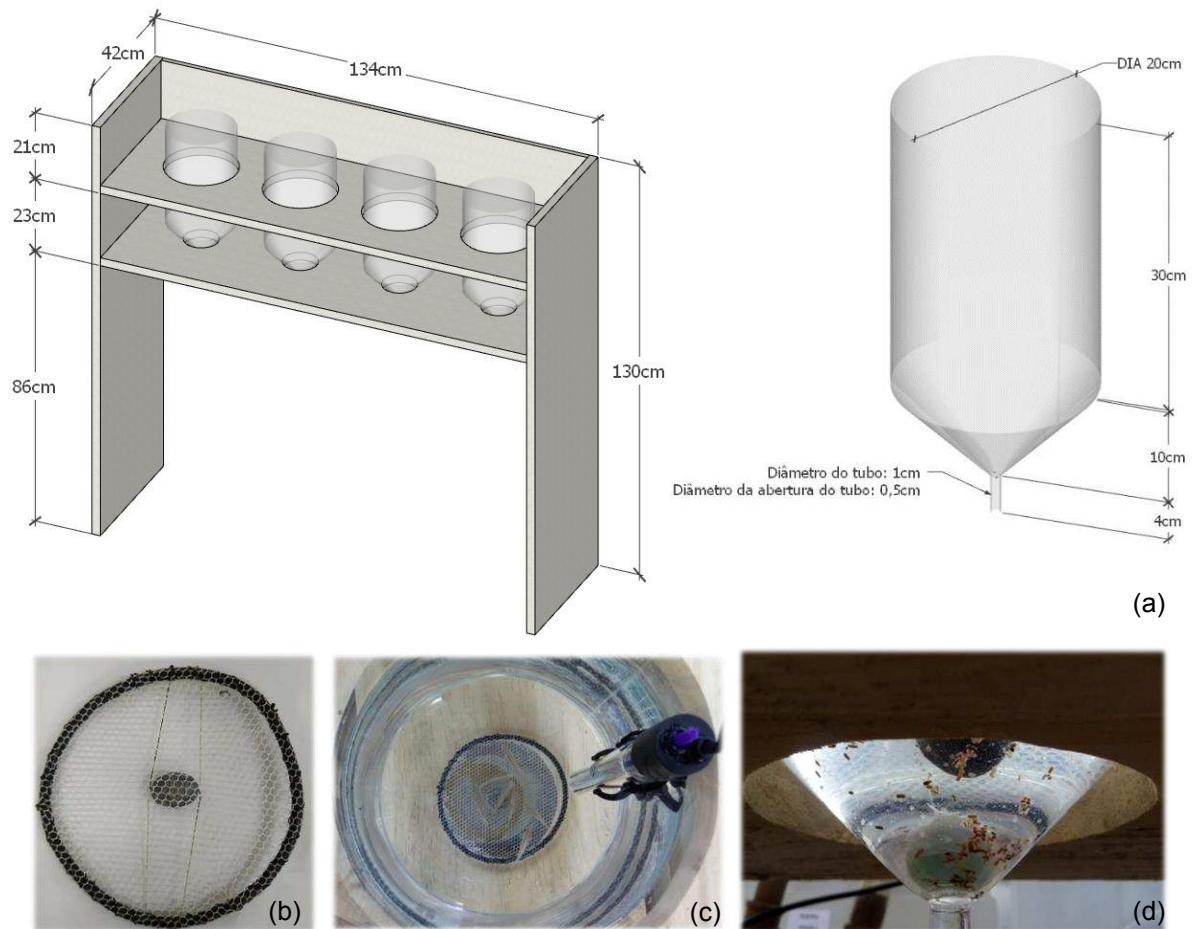


Figura 15 – (a) ilustração esquemática dos aquários utilizados no ensaio de VTG, (b) telas de malha para impedir a predação dos ovos pelos peixes, (c) vista superior do aquário e (d) bola de gude para impedir a passagem dos peixes ao tubo de saída da água.

Os aquários foram dispostos em conjunto de quatro unidades em dois suportes fabricados em madeira de pinos com orifícios de 21 cm de diâmetro na parte superior e de 10 cm na parte inferior.

Com o objetivo de evitar a predação dos ovos pelos peixes, no fundo dos aquários, foram adicionadas telas de malha com aberturas de 2,5 mm e pesos ligados a essas malhas para impedir o acesso dos peixes e propiciar com facilidade a passagem dos ovos. Uma bola de gude presa por cola de silicone atóxica em um anzol foi adaptada no fundo de cada aquário para facilitar a retirada de água dos aquários e evitar que peixes que eventualmente passassem pela tela, pudessem entrar no tubo de saída.

4.8.2.6 Exposição

Cada aquário continha 5 litros de água ou solução-teste, aerados pelo uso de um compressor de ar e pedras porosas (Figura 16). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, nos períodos da manhã e da tarde, com a ração Alcon Basic. A temperatura foi mantida com o uso de termostatos em 26 ± 2 °C, o fotoperíodo foi de 12 h luz/12 h escuro e iluminância média de 500 lux com o uso de lâmpadas fluorescentes brancas.

O teste foi conduzido em regime semiestático, com renovações diárias de 50% das soluções-teste. O volume de amostra a ser utilizado nas renovações foi descongelado durante a noite anterior às trocas.

Os ovos produzidos foram recolhidos e contados diariamente. Parâmetros físico-químicos como pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica foram registrados semanalmente nos aquários. Para essas medições, foi utilizado o sensor multiparâmetro portátil da *Hach* modelo HQ40D. A temperatura foi monitorada diariamente com termômetro de vidro com mercúrio. Duas vezes durante o período do ensaio foram quantificados alcalinidade, dureza e nitrogênio amoniacal total nos aquários.

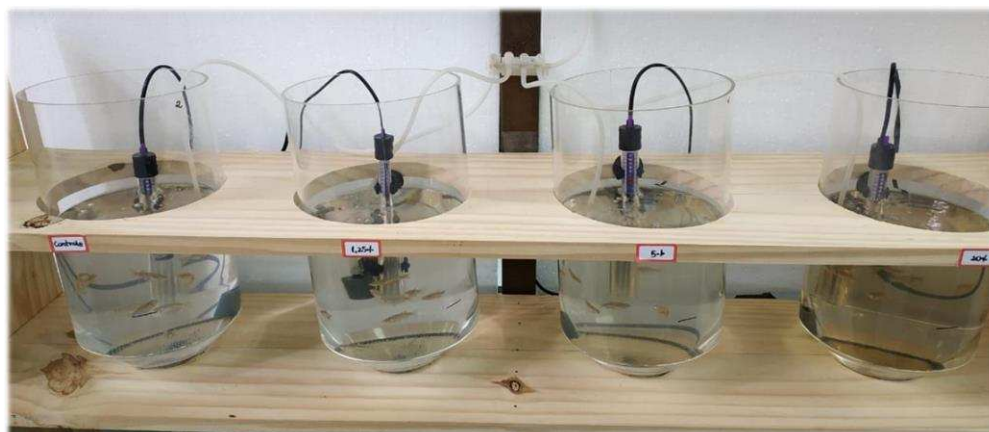


Figura 16 – Aquários durante período de ensaio com esgoto tratado.

4.8.2.7 Término do ensaio

No dia 21 de cada teste, ao término do período de exposição, os peixes foram eutanasiados com uma solução de triclaína (Sigma-Aldrich, número CAS: 886-86-2) a 470 mg.L^{-1} tamponada com 300 mg.L^{-1} de bicarbonato de sódio.

Em seguida, cada peixe foi pesado (peso molhado), agrupado quanto ao sexo e à concentração de exposição, adicionados em tubos *Eppendorf* de 5 mL e conservados em gelo até o congelamento em ultrafreezer a -80°C .

4.8.2.8 Análise de vitelogenina (VTG)

A determinação quantitativa de VTG nas amostras de peixes foi feita de acordo com o protocolo do fabricante do kit (Biosense Laboratories®). As placas do kit já se encontravam pré-revestidas com anticorpo específico que se liga à VTG presente nas amostras e na solução padrão adicionadas aos poços. Todas as soluções, exceto a de H_2SO_4 2 mol.L^{-1} , foram preparadas com os materiais presentes no kit de análise.

Quatro peixes de cada aquário foram selecionados para a análise, sendo dois machos e duas fêmeas, perfazendo um número amostral (por sexo) igual a 4, considerando as duas réplicas. Após descongelamento em gelo, os peixes foram abertos pela parede corporal ventral com auxílio de tesoura e o sexo foi confirmado por exame macroscópico das gônadas. Em seguida, os peixes inteiros foram macerados individualmente, sob refrigeração, em almofariz plástico. Os volumes (em mL) da solução tampão (Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} , pH 7,4 e coquetel inibidor de protease a 1% (Sigma)) utilizados corresponderam ao dobro da massa (em g) do organismo (OCDE, 2012). Os homogeneizados dos peixes foram adicionados em tubos *Eppendorf* de 2 mL e, logo após, centrifugados a 20.000 g por 45 minutos a 4°C (centrífuga *Hanil Scientific*, modelo *Smart R17*). As etapas dos processos citados são apresentadas na Figura 17.

A porção líquida (plasma) entre a camada de gordura e o resíduo sedimentado, foi distribuída em tubos *Eppendorf* e congelada a -80°C até o momento da análise de ELISA para VTG.

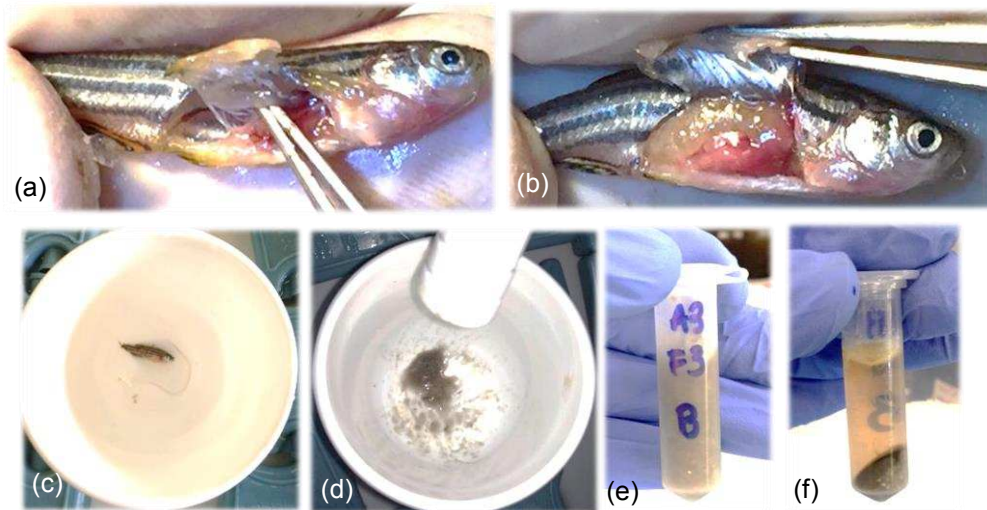


Figura 17 – Etapas de identificação do sexo dos peixes e preparo do homogeneizado. (a) macho, (b) fêmea, (c) peixe em solução tampão, (d) peixe após maceração, (e) homogeneizado em tubos antes e (f) após centrifugação.

No momento da análise, as amostras foram descongeladas em gelo e diluídas em solução tampão de diluição de albumina de soro bovino (BSA) a 1% e solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,3. As diluições utilizadas foram sugeridas pelo fabricante (1:500 para os machos e 1:30.000 para as fêmeas).

A curva-padrão foi preparada pela solubilização do padrão de VTG de *D. rerio*, purificado e liofilizado, em tampão de diluição. As concentrações utilizadas estavam compreendidas entre 0,12 e 125 ng.mL⁻¹ com espaçamento constante igual a 2.

Nos poços A1 e B1 das placas, adicionou-se somente a solução tampão de diluição a fim de identificar possíveis ligações que não as de interesse (sinal não-específico - NSB). Aos poços de 2 a 12 das linhas A e B foram adicionadas as diluições da curva-padrão. Os demais poços foram preenchidos com as amostras em duplicata, sendo uma placa para análise dos organismos machos e uma placa para as fêmeas (Figura 18).

Após o preparo das diluições das amostras e da curva, transferiram-se 100 µL das diluições para cada poço correspondente. Em seguida, as placas foram seladas e incubadas à temperatura de 23°C por 1 h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NSB	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
B	NSB	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
C	A1	A4	A7	A10	A13	A16	A19	A22	A25	A28	A31	A34
D	A1	A4	A7	A10	A13	A16	A19	A22	A25	A28	A31	A34
E	A2	A5	A8	A11	A14	A17	A20	A23	A26	A29	A32	A35
F	A2	A5	A8	A11	A14	A17	A20	A23	A26	A29	A32	A35
G	A3	A6	A9	A12	A15	A18	A21	A24	A27	A30	A33	A36
H	A3	A6	A9	A12	A15	A18	A21	A24	A27	A30	A33	A36

Figura 18 – Esquema de distribuição das curvas e amostras nas placas ELISA. Curva (C1 a C11), amostras (A1 a A36), sinal não específico (NSB).

Ao final do tempo de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com 300 μL da solução tampão de lavagem (PBS, tensoativo não-iônico *Tween-20* a 0,05%) por poço em lavadora de microplacas (*Wellwash*, pente 1x12, *Thermo Scientific*). Adicionaram-se 100 μL do anticorpo de detecção e, então, as placas foram novamente seladas e incubadas pelo período de 1h.

Após nova lavagem em triplicata com 300 μL de solução de lavagem por poço, foram adicionados 100 μL do anticorpo secundário (conjugado peroxidase de raiz-forte *Armoracia rusticana* – HPR) em cada poço. Após selar as placas, incubou-se por mais 1h a 23°C.

Posteriormente, os poços foram lavados 5 vezes com 300 μL de solução de lavagem e adicionaram-se 100 μL da solução de substrato (o-fenilenodiamina peroxidase - OPD) a todos os poços. As placas foram seladas e incubadas a 23°C no escuro, por mais 30 minutos. Ao final desse período, a reação de peroxidase foi interrompida com a adição de 50 μL de H_2SO_4 mol.L⁻¹ a todos os poços. Após 5 minutos, a absorbância foi lida em leitor de microplacas (*Multiskan GO*, *Thermo Scientific*) a 492 nm (Figura 19).

Em cada placa, calculou-se a média das absorbâncias dos dois poços NSB. Esse valor foi subtraído dos valores de absorbância de todos os outros poços da mesma placa, obtendo-se, assim, os valores de absorbância corrigidos para as diluições da amostra e da curva-padrão.

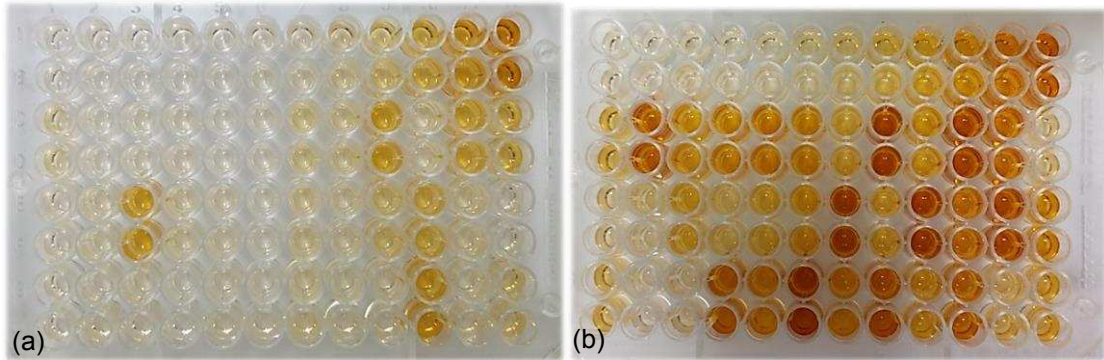


Figura 19 – Placas ELISA logo após a leitura de VTG (a) machos e (b) fêmeas.

Pelo cálculo da média das absorbâncias corrigidas para as diluições da solução-padrão, foi construída a curva analítica plotando-se a absorbância contra a concentração de VTG. A faixa de trabalho da curva foi determinada excluindo-se os pontos não inseridos na linha de regressão para obtenção de um coeficiente de correlação superior a 0,990. Também foram excluídos os pontos com absorbância corrigidas inferiores a 0,020, conforme recomendação do fabricante.

A partir da equação da curva analítica, da absorbância média corrigida de cada amostra e do fator de diluição de cada extrato, calcularam-se as concentrações de VTG presentes nos homogeneizados dos peixes em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas foram relacionadas ao volume das amostras diluídas adicionadas aos poços da placa (100 μL) e à massa de cada organismo (g). Desta forma, obteve-se o valor das concentrações em micrograma de VTG por grama de peixe ($\mu\text{g VTG.g}^{-1}$ peixe), conforme a Equação 5:

$$VTG \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = x \times \frac{0,1 \text{ mL}}{y} \quad (\text{Equação 5})$$

em que: x é a concentração de VTG nos homogeneizados dos peixes ($\mu\text{g.mL}^{-1}$);
y é a massa do peixe (g).

Os resultados de VTG das amostras com absorbância superiores à absorbância máxima da curva-padrão foram calculados considerando a concentração máxima da curva.

4.9 Análise dos dados

Para verificar diferenças estatísticas significativas entre os ensaios preliminares com as amostras com e sem filtração foi utilizado o tratamento estatístico apresentado no Anexo B (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006), que considera o intervalo de confiança superior e os índices de CE₅₀ ou CL₅₀ que se deseja comparar.

Nos ensaios definitivos, os valores de CL(I)₅₀ das três repetições de cada ensaio foram testados quanto à normalidade e à homocedasticidade, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene ($\alpha < 0,05$), respectivamente. A sensibilidade dos diferentes ensaios foi comparada pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Para os ensaios de estrogenicidade foram consideradas as duas réplicas para contabilizar a produção média diária de ovos por fêmea viva. A normalidade e as diferenças estatísticas foram verificadas pelo emprego dos testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov Smirnov, ANOVA, Tukey e Levene ($\alpha = 0,05$). Quando normalidade e homocedasticidade não foram identificadas, a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os resultados das análises de VTG foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias com os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os grupos foram comparados com seus respectivos controles através da ANOVA, seguido do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Para verificar diferenças entre os grupos de amostras diferentes, os dados foram transformados em raiz quadrada ou log (x+1) para atender as premissas de normalidade (Kolmogorov Smirnov e Levene). A diferença entre os grupos foi verificada por meio da ANOVA e teste Fisher ($\alpha = 0,05$).

Para realização dos cálculos e construção dos gráficos foram utilizados os programas de computador *Origin 2019b Trial License* (OriginLab®, EUA) e *Prism 8 Free Trial* (GraphPad, EUA), respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de sensibilidade

Os valores de $CL(I)_{50}$ e seus intervalos de confiança para o ensaio de sensibilidade ao NaCl são apresentados na Tabela 3. O VCest para os ensaios com as larvas foi de 0,63 e 0,67 $g.L^{-1}$, similar ao reportado por Bertolletti (2009), que foi de 0,60 $g.L^{-1}$. Para os embriões, os resultados encontrados também foram próximos à $CL(I)_{50}$ 96 h de 7,2 $g.L^{-1}$, apresentada por Busquet *et al.* (2014).

Tabela 3 – $CL(I)_{50}$ e intervalos de confiança dos ensaios de sensibilidade dos organismos-teste ao cloreto de sódio ($g.L^{-1}$)

Organismo-teste	Réplica I	Réplica II
Embrião (96h)	7,56 (6,45 – 8,86)	8,19 (6,46 – 10,4)
Embrião-larval (168h)	5,59 (5,36 – 5,82)	4,45 (3,50 – 5,65)
Larva	3,03 (2,72 – 3,38)	3,03 (2,75 – 3,34)
<i>C. dubia</i> (sobrevivência)	1,05 (0,706 – 1,15)	2,06 (1,91 – 2,21)

5.2 Ensaio preliminares

Com o estudo preliminar para os bioensaios de toxicidade crônica e aguda determinou-se as diluições a serem empregadas nos testes definitivos. Nesse estudo, observou-se a predação das larvas do peixe-zebra por microrganismos presentes no esgoto. Por isso as amostras foram filtradas em membranas com porosidade de 0,22 μm com o propósito de reduzir essa interferência. Dado que a toxicidade poderia ser proveniente de substâncias suspensas no esgoto, testes foram conduzidos com as amostras de esgoto filtrado e não filtrado (Tabela 4).

A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 5 e na Figura 20, pode-se concluir que não houve diferenças estatísticas significativas de toxicidade entre amostras com e sem filtração na maioria dos ensaios, de acordo com o tratamento estatístico apresentado por Zagatto e Bertolletti (2006). É possível inferir também, que os constituintes dissolvidos são os principais responsáveis pela toxicidade nos esgotos avaliados.

Tabela 4 – Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras dos ensaios preliminares com e sem filtração em membranas de 0,22 µm

Parâmetro	Esgoto Bruto	Esgoto Bruto Filtrado	Esgoto Tratado	Esgoto Tratado Filtrado
pH	7,4	7,6	7,7	8,2
OD (mg.L ⁻¹)	1,95	7,94	3,01	5,39
CE (µs.cm ⁻¹)	1123	1095	1086	1222
COD (mg.L ⁻¹)	101	96,7	43,2	38,9
DQO (mg.L ⁻¹ O ₂)	647	314	174	108
DQOs (mg.L ⁻¹ O ₂)	299		115	
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	81,8	79,1	72,2	67,1
S ⁻² solúvel (mg.L ⁻¹)		4,8		7,1

Considerando que, apesar da alteração nas características físico-químicas dos esgotos após a filtração, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados de concentração letal ou inibitória nos organismos-teste (com apenas uma exceção), definiu-se o emprego dos esgotos sem filtração para os ensaios definitivos e a filtração somente para os ensaios com as larvas, devido à predação das mesmas pelos microrganismos presentes nos esgotos (Figura 21).

Tabela 5 – Verificação estatística de diferenças significativas entre os ensaios com as amostras filtradas e não filtradas em membranas de 0,22 µm

Ensaio	Esgoto Bruto			Esgoto Tratado		
	H*	Z*	Diferença	H*	Z*	Diferença
FET 96 h	1,22	1,12	Não	1,30	1,34	Sim
FET 168 h	1,23	1,16	Não	1,37	1,24	Não
<i>C. dubia</i> Sobrevivência	1,16	1,16	Não	3,97	1,64	Não
<i>C. dubia</i> Reprodução	1,99	1,06	Não	6,87	2,17	Não

*Se Z > H: existe diferença significativa entre os valores de CL₅₀.

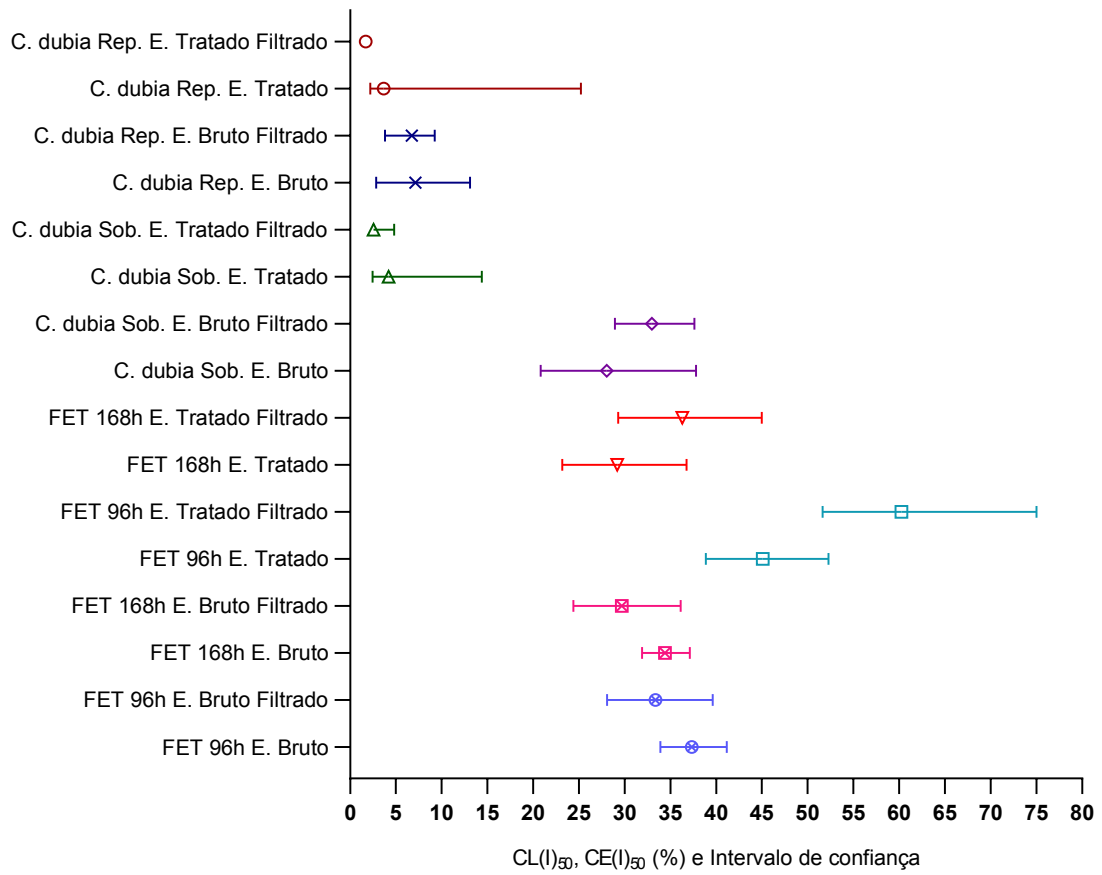


Figura 20 – CL(I)₅₀, CE(I)₅₀ e seus intervalos de confiança no ensaio preliminar (%).



Figura 21 – Larva predada após 48 h do início do ensaio preliminar vista por microscópio (aumento de 40x).

5.3 Caracterização físico-química dos esgotos nos ensaios definitivos

A caracterização dos esgotos bruto e tratado é apresentada na Tabela 6. A carga orgânica volumétrica (COV) aplicada na alimentação do reator foi de 1,74 kg DQO. m⁻³. d⁻¹, com eficiência de remoção de DQO total igual a 81%. A COV de alimentação do reator situou-se ligeiramente abaixo dos valores comumente aplicados, de 2,5 a 3,5 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ (CHERNICHARO, 2007).

Tabela 6 – Resultados dos parâmetros físico-químicos dos esgotos bruto e tratado no ensaio definitivo

Parâmetro	Esgoto Bruto	Esgoto Bruto Filtrado	Esgoto Tratado	Esgoto Tratado Filtrado
pH	7,4	7,5	8,01	8,01
OD (mg.L ⁻¹)	1,85	7,04	6,94	5,98
CE (µs.cm ⁻¹)	966	912	1091	1071
COD (mg.L ⁻¹)	112	114	25,8	27,1
DBO (mg.L ⁻¹ O ₂)	294		20	
DQO (mg.L ⁻¹ O ₂)	654	334	121	75
DQOs (mg.L ⁻¹ O ₂)	299		78	
ST (mg.L ⁻¹)	613	476	461	442
SST (mg.L ⁻¹)	187		29,4	
SSV (mg.L ⁻¹)	162		28,8	
NTK (mg.L ⁻¹)	79,4	64,9	90,6	87,8
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	57,4	57,0	84,7	75,9
S ⁻² solúvel (mg.L ⁻¹)		9,62		9,8
P (mg.L ⁻¹)	11,7	9,12	12,7	11,3
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	262	228	394	368

Dentre os parâmetros avaliados no esgoto tratado, que são regulamentados pela legislação de Minas Gerais (COPAM, CERH, 2008), todos apresentaram valores abaixo dos limites máximos de lançamento de efluentes, com DQO total de 121 mg.L⁻¹ (< 180 mg.L⁻¹); DBO₅ igual a 20 mg.L⁻¹ (< 60 mg.L⁻¹); pH entre 6 e 9 e teor de SST iguais a 29 mg.L⁻¹ (< 100 mg.L⁻¹).

O reator não apresentou eficiência em relação à remoção de nutrientes, pelo contrário, apresentou produção de fósforo (-7,7%) e de nitrogênio amoniacal total (-32%) pela amonificação. Não há limite legal de lançamento de N-NH₃ para sistemas

de tratamento de esgotos sanitários, mas a concentração obtida (85 mg.L^{-1}) é muito superior ao valor máximo exigido para lançamento de efluentes não oriundos de ETE que tratam esgotos sanitários (20 mg.L^{-1}). Da mesma forma, a concentração de sulfeto encontrada excede o valor máximo de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para lançamento de efluentes industriais.

5.4 Toxicidade aguda e crônica

5.4.1 FET 96 h e peixe adulto

Os ensaios de toxicidade aguda no estágio embrionário do peixe-zebra não revelaram diferença estatística em comparação com o resultado de $CL(I)_{50}$ na exposição do peixe adulto ao esgoto tratado (Tabela 7). Do mesmo modo, Stelzer *et al.* (2018), em exposição de embriões e juvenis de *D. rerio* à amostra de efluente hospitalar não tratado, não observaram diferença estatística significativa entre os dois ensaios.

A similaridade entre os métodos foi apontada no estudo de Lammer *et al.* (2009), em que foi realizada avaliação comparativa dos dados de toxicidade de 142 substâncias químicas para embriões e peixes adultos. Os resultados confirmaram que os ensaios com as duas fases de vida do peixe não apresentam diferenças estatísticas e forneceram informações científicas importantes para introduzir o FET como um substituto para o teste de toxicidade aguda com peixes adultos. Ademais, o FET se comprova ser um método que também permite avaliar efeitos subletais nos organismos, apresentando assim mais uma vantagem em comparação ao ensaio agudo com peixes adultos.

As Tabelas B-1 e B-2 (Apêndice B) apresentam, respectivamente, os pesos dos peixes e os parâmetros físico-químicos dos aquários no ensaio com peixe adulto.

Tabela 7 – CL_{50} e intervalos de confiança (%) para os ensaios FET 96 h e peixe adulto no esgoto tratado

Ensaio	Réplica I	Réplica II	Réplica III
FET 96 h	33,9 (31,8 - 36,0)	30,9 (25,5 - 37,4)	33,2 (29,0 - 38,1)
Peixe Adulto	32,9 (28,6 - 37,7)		

5.4.2 FET 96 h e FET 168 h

Durante os ensaios preliminares, nas maiores concentrações utilizadas nos testes (50% e 100%), a partir do 4º dia de exposição, foi observada mortalidade das larvas recém eclodidas do controle interno de cada placa. A mortalidade possivelmente foi devida a compostos voláteis presentes nos esgotos ou a gases dissolvidos que volatilizavam e se solubilizavam na água de cultivo. A partir dessa observação, sob a tampa de cada placa foi utilizado, nos ensaios definitivos, um filme plástico de parafina (Parafilm), com a finalidade de evitar contaminação semelhante. Ainda assim, devido aos vãos existentes entre os poços impedirem a vedação completa, foi registrada a mortalidade de parte dos organismos-teste do controle interno das placas de concentração igual a 100%, em ambas as amostras, logo após a eclosão dos ovos.

Essa observação, apesar de não ser comprovada neste estudo, pode ser relacionada aos parâmetros quantificados na caracterização das amostras, como por exemplo ao sulfeto solúvel, que apresentou concentrações iguais a 9,6 mg.L⁻¹ no esgoto bruto e 9,8 mg.L⁻¹ no esgoto tratado; e ao nitrogênio amoniacal, com concentrações aproximadas de 57 mg.L⁻¹ no esgoto bruto e 85 mg.L⁻¹ no esgoto tratado.

Ao avaliar a constante adimensional de Henry (H), é conhecido que compostos que apresentam $H > 0,1$ são considerados bastante voláteis (PEREIRA; ANDRADE, 1997; MATTER-MÜLLER; GUJER; GIGER, 1981). O sulfeto de hidrogênio, gás tóxico tanto para organismos aquáticos, quanto aos seres humanos, possui H igual a 0,36 a 20 °C, já a amônia apresenta H igual a $5,61 \times 10^{-4}$ a 20 °C (METCALF; EDDY, 2016). Assim, o sulfeto de hidrogênio é mais volátil do que a amônia.

As concentrações de amônia não ionizada nas amostras foram de 0,80 mg.L⁻¹ no esgoto bruto (pH 7,4 a 25 °C), e 4,6 mg.L⁻¹ no esgoto tratado (pH 8,01 a 25 °C). Para o esgoto tratado, essa concentração foi superior à CL(I)₅₀ para *D. rerio* (1,3 mg.L⁻¹) (BERTOLETTI, 2009). Esses valores foram calculados a partir da equação apresentada por Metcalf e Eddy (2016), disponível no ANEXO C.

Wu *et al.* (2016) investigaram os efeitos do sulfeto solúvel no desenvolvimento de embriões do peixe-zebra e obtiveram CL₅₀ no ensaio agudo de 96 h igual a 6,5 mg.L⁻¹, com intervalo de confiança de 3,7 mg.L⁻¹ a 12 mg.L⁻¹. O estudo também ressalta que altas concentrações de sulfeto (superiores a 3,4 mg.L⁻¹) causam várias

anormalidades no desenvolvimento do embrião, enquanto baixas concentrações (0,34 mg.L⁻¹ a 1,7 mg.L⁻¹) aumentam a velocidade cardíaca e sua velocidade de desenvolvimento.

Considerando que o estágio larval do peixe-zebra é mais sensível que seus outros estágios de desenvolvimento em ambas as amostras empregadas, pode-se inferir que o gás sulfídrico, presente em altas concentrações e considerado bastante volátil, é um possível responsável pela mortalidade das larvas nos controles internos das placas sem diluição (100% de amostra).

Os resultados de CL(I)₅₀ tanto para o ensaio de toxicidade aguda (FET 96 h) quanto para o ensaio crônico de curta duração (FET 168 h) apresentaram normalidade e baixa variabilidade, com os coeficientes de variação (CV) iguais a 9% e a 5%, respectivamente.

A comparação dos resultados de FET 96 h indica que não houve diferença estatística entre o esgotos bruto e tratado (eficiência de -7%), encontrando-se a CL(I)₅₀ das duas amostras entre 30% e 38%, com intervalos de confiança abrangendo concentrações de esgoto desde 25% a 42% (Tabela 8). Da mesma forma, não foram identificadas diferenças significativas nos resultados de concentração letal para os ensaios FET estendidos até 168 h, entre as duas amostras analisadas neste estudo, sem eficiência de remoção de toxicidade (-2%).

Tabela 8 – CL(I)₅₀ e intervalos de confiança (%) para os ensaios FET nos esgotos bruto e tratado

Ensaio	Réplica I	Réplica II	Réplica III
FET 96h - E. Bruto	31,8 (28,5 - 35,6)	38,1 (34,6 - 41,9)	35,4 (30,3 - 41,3)
FET 168h - E. Bruto	28,3 (24,5 - 32,7)	21,9 (18,7 - 25,8)	32,6 (29,8 - 35,8)
FET 96h - E. Tratado	33,9 (31,8 - 36,0)	30,9 (25,5 - 37,4)	33,2 (29,0 - 38,1)
FET 168h - E. Tratado	25,2 (20,6 - 31,0)	26,4 (21,3 - 32,8)	29,5 (21,0 - 41,5)

Os ensaios FET de 96 h e estendidos a 168 h, nas duas amostras, não apresentam diferenças estatísticas significativas entre si. Nos dois ensaios, as

amostras são classificadas como altamente tóxicas, com as médias das $CL(I)_{50}$ compreendidas entre 25% e 50%.

As Figura 22 e Figura 23 apresentam o desenvolvimento dos embriões na primeira réplica dos ensaios, nos esgotos bruto e tratado, respectivamente. No esgoto bruto, a partir da concentração de 25%, nota-se um considerável atraso no desenvolvimento, e na concentração de 50% o ovo já se encontra coagulado. Na concentração de 50%, no esgoto tratado, o embrião apresenta uma deformação em seu saco vitelínico. Nas duas amostras a concentração de 100% provocou a morte imediata dos ovos (< 24 h). Nas demais concentrações, os embriões se desenvolveram normalmente, comparados ao controle. Nos Apêndices C, D e E são apresentados o desenvolvimento dos embriões em todo o período de teste.

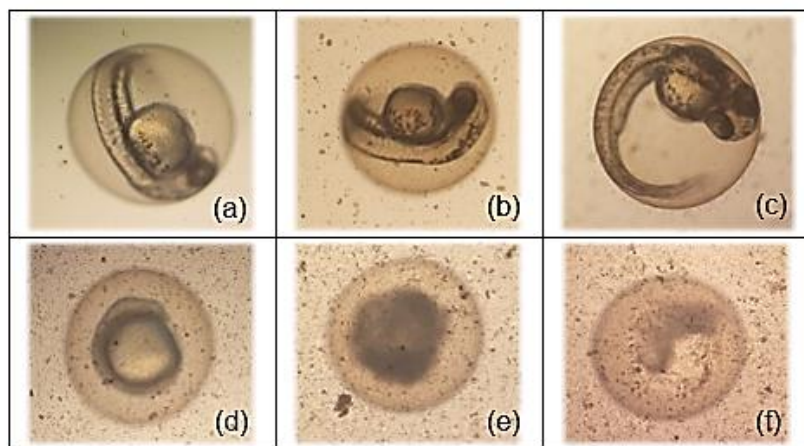


Figura 22 – Desenvolvimento do embrião no ensaio FET com esgoto bruto a 48 h. (a) controle negativo, (b) 6,25%, (c) 12,5%, (d) 25%, (e) 50% e (f) 100%.

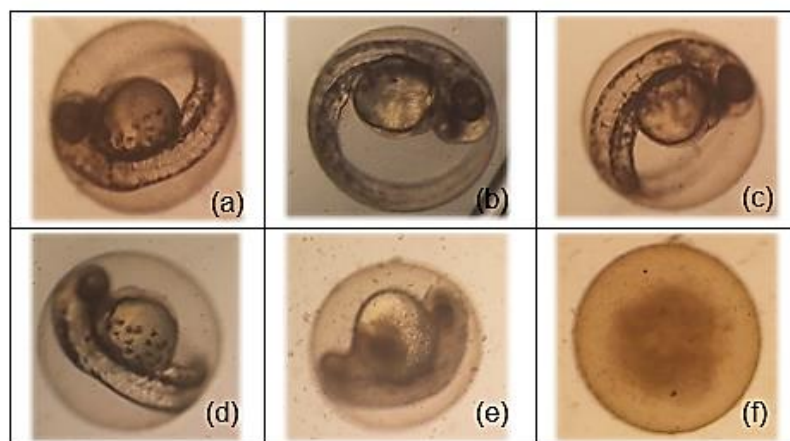


Figura 23 – Desenvolvimento do embrião no ensaio FET com esgoto tratado a 48 h. (a) controle negativo, (b) 6,25%, (c) 12,5%, (d) 25%, (e) 50% e (f) 100%.

Os efeitos tóxicos das amostras sobre os embriões podem ser relacionados às altas concentrações de compostos nocivos presentes nos esgotos sanitários mesmo após o tratamento, como alguns dos parâmetros quantificados neste estudo e comprovadamente tóxicos aos embriões de *D. rerio*, como o sulfeto solúvel e o nitrogênio amoniacal.

5.4.3 Larvas

Os resultados de $CL(I)_{50}$ para o esgoto bruto (Tabela 9), apesar de apresentarem maior variabilidade em comparação a dos demais ensaios, foram distribuídos normalmente e apresentam variância homogênea entre os grupos. Esses valores permitem concluir que as amostras de esgoto sanitário bruto são extremamente tóxicas ($CL(I)_{50} < 25\%$) a esse estágio de desenvolvimento do peixe-zebra. De maneira semelhante, o esgoto tratado apresentou extrema toxicidade ao estágio larval do peixe, exibindo menor amplitude entre as repetições, com $CL(I)_{50}$ mínima de 0,475% e máxima de 1,39%.

O tratamento não removeu a toxicidade (eficiência média de -77%), e as duas amostras não diferenciaram estatisticamente.

Tabela 9 – $CL(I)_{50}$, intervalos de confiança e VC_{est} (%) para os ensaios com as larvas nos esgotos bruto e tratado

Réplica	Esgoto Bruto		Esgoto Tratado	
	$CL(I)_{50}$, %	VC_{est} , %	$CL(I)_{50}$, %	VC_{est} , %
I	2,33 (1,57 - 3,47)	0,987	0,987 (0,714 - 1,34)	0,069
II	0,460 (0,365 - 1,01)	1,39	1,39 (0,902 - 2,37)	0,090
III	9,66 (9,18 - 10,3)	0,475	0,475 (0,399 - 0,559)	0,037

5.4.4 *Ceriodaphnia dubia*

Diferentemente dos ensaios anteriores, o tratamento biológico anaeróbio reduziu, de forma significativa, a toxicidade sobre a sobrevivência do microcrustáceo *C. dubia*, atingindo eficiência média de remoção igual a 85% (Tabela 10). De toda forma, os resultados obtidos com o microcrustáceo nas duas amostras, em ambos os indicadores, ainda indicam extrema toxicidade (CL_{50} e $CI_{50} < 25\%$). De maneira semelhante, Düpont e Lobo (2012), ao investigarem a toxicidade dos afluentes e

efluente de uma ETE composta de reator UASB e biofiltro, encontraram efluentes extremamente tóxicos à *C. dubia*.

A maior toxicidade do esgoto bruto à *C. dubia* em relação ao peixe *D. rerio* observada neste estudo pode ser relacionada à sua maior sensibilidade a parâmetros como DQO e DBO. Correlações significativas entre o aumento de DBO e a redução na reprodução de *C. dubia* foram encontradas quando analisada a relação entre toxicidade e os parâmetros orgânicos em efluentes de indústrias de papel kraft (RAPTIS; JURASKE; HELLWEG, 2014). De forma similar, a toxicidade aguda à *Daphnia magna* foi relacionada com o aumento da DQO em efluentes de indústria têxtil (EREMEKTAR; SELCUK; MERIC, 2007).

Tabela 10 – CE(I)₅₀, CL(I)₅₀ e intervalos de confiança (%) para os efeitos crônicos sobre a reprodução e sobre a sobrevivência de *C. dubia* nos esgotos bruto e tratado

Réplica	Esgoto Bruto		Esgoto Tratado	
	Sobrevivência	Reprodução	Sobrevivência	Reprodução
I	3,42 (2,01 - 7,47)	1,78 (1,69 - 2,09)	30,3 (25,3 - 36,4)	9,36 (0,198 - 11,1)
II	4,95 (2,75 - 25,0)	1,83 (1,69 - 3,88)	21,2 (16,2 - 27,8)	17,1 (5,69 - 18,1)
III	2,01 (1,69 - 2,45)	1,69 (1,69 - 1,69)	18,9 (13,9 - 25,7)	8,82 (N/A-N/A)*

*N/A: intervalo de confiança não calculável.

Os resultados apresentados até aqui revelam a incapacidade do sistema UASB em remover a toxicidade, uma vez que tanto o esgoto bruto quanto o esgoto tratado foram classificados como extremamente tóxicos e altamente tóxicos em todos os ensaios realizados.

A Figura 24 reúne as médias de CL(I)₅₀, CE(I)₅₀ e os intervalos de confiança de todos os ensaios de toxicidade aguda e crônica realizados. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de cada grupo.

Pelas regiões ocupadas no gráfico, é possível perceber dois ensaios mais sensíveis aos esgotos avaliados nesta pesquisa, que apresentaram CL(I)₅₀ e CE(I)₅₀ inferiores a 25%: ensaio crônico de curta duração com as larvas do peixe-zebra e ensaio crônico com o microcrustáceo *C. dubia*, sendo que o primeiro apresentou uma sensibilidade maior que o segundo.

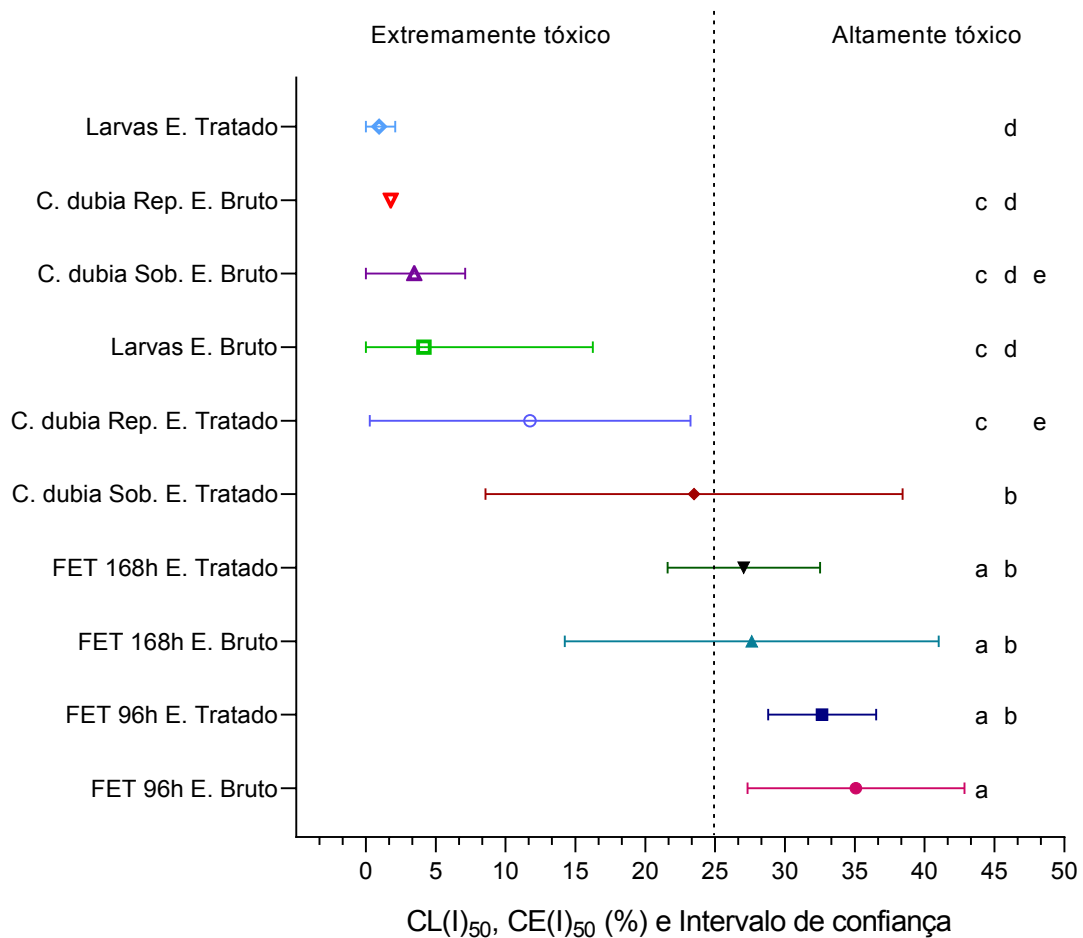


Figura 24 – CE(I)₅₀, CL(I)₅₀ e seus intervalos de confiança nos ensaios definitivos (3 repetições). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

Tendo em vista as limitações associadas aos sistemas anaeróbios em gerar efluentes capazes de atender aos padrões estabelecidos pelas legislações ambientais, faz-se necessário a implementação de pós-tratamento com o objetivo de polimento das qualidades microbiológica e ecotoxicológica. Com melhor remoção de matéria orgânica e de nutrientes.

5.5 Atividade estrogênica

5.5.1 Ensaio YES

A curva padrão do ensaio YES para o 17 β -estradiol é apresentada na Figura 25 pela regressão sigmoidal dose-resposta. A concentração na curva compreendeu a faixa de 1,30 ng.L⁻¹ a 2,72 μ g.L⁻¹, com CE₅₀ igual a 62,9 ng.L⁻¹.

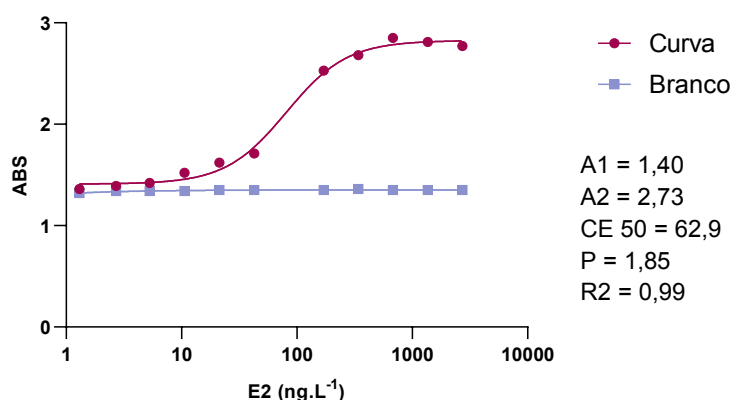


Figura 25 – Curva dose-resposta da absorvância em função da log concentração de 17 β -estradiol (ng.L⁻¹).

As duas amostras empregadas nesta pesquisa apresentaram atividade estrogênica, sendo que a concentração no esgoto bruto foi igual a 27 ng EQ-E2.L⁻¹ e após o tratamento, houve incremento da estrogenicidade, com concentração de 40 ng EQ-E2.L⁻¹ no esgoto tratado. Valor semelhante foi encontrado para amostra de esgoto bruto analisada por Kanda e Churchley (2008) na cidade de Warwickshire, Inglaterra (22 ng de EQ-E2.L⁻¹). Smital e colaboradores (2011) na cidade de Zagreb, Croácia encontraram 11 ng de EQ-E2.L⁻¹ no esgoto bruto.

O incremento da estrogenicidade após processos de tratamento anaeróbio pode estar atribuído à formação de subprodutos estrogenicamente ativos, pois 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol presentes nos esgotos brutos em sua forma conjugada são facilmente clivados no esgoto, presumidamente pela enzima β -glicuronidase (PLAHUTA *et al.*, 2017). O aumento das concentrações de nonilfenol em efluente após tratamento em reator UASB devido à degradação anaeróbia dos alquilfenóis polietoxilados (compostos presentes nas formulações de produtos de limpeza) também foi descrito por Queiroz *et al.* (2012).

A concentração efetiva de E2 necessária para indução significativa de VTG em adultos de peixe-zebra encontra-se entre 5 e 25 ng.L⁻¹, e a concentração necessária para a modificação de característica sexual secundária nos machos está entre 25 e 100 ng.L⁻¹ de E2, bem como para a inibição da produção de ovos (BRION *et al.*, 2004).

Tendo em vista que as concentrações de substâncias capazes de mimetizar a ação de 17 β -estradiol tanto no esgoto bruto quanto no esgoto tratado estão acima dos valores de efeito encontrados na literatura, dependendo da capacidade de diluição do

corpo receptor após descarga no meio ambiente, os esgotos analisados possuem potencial de causar desregulação endócrina nos organismos expostos.

5.5.2 Ensaio de vitelogenina (VTG)

A CMT obtida no ensaio de toxicidade aguda foi de 25%. A partir desse valor e considerando os tempos de exposição do ensaio agudo (2 dias) e do ensaio crônico para quantificação de VTG (21 dias), foi estipulada a concentração máxima de 20% para a exposição. As concentrações utilizadas foram de 0% (controle negativo, aquários 1 e 2), 1,25% (aquários 3 e 4), 5% (aquários 5 e 6) e 20% (aquários 7 e 8),

Durante os períodos dos dois ensaios não foram observados comportamentos anormais nos organismos-teste comparados ao controle, como natação descoordenada ou alimentação atípica. Da mesma forma, não foram observadas anormalidades externas (como hemorragia e descoloração).

Ao longo dos 21 dias de ensaio, para as duas amostras, foram realizadas 4 medições de pH, OD, CE e temperatura nos aquários (APÊNDICE F, Tabelas F-1 e F-2). No ensaio com esgoto bruto (ensaio 1) a temperatura da água de cada aquário atingiu amplitude máxima de 3,3 °C, na faixa de 24,5 a 27,8 °C. Com o esgoto tratado (ensaio 2) a amplitude máxima foi de 1,6 °C, variando entre 23,6 e 25,2 °C. Entre os aquários, a diferença das temperaturas medidas alcançou 2,2 °C no ensaio 1 e 1,9 °C no ensaio 2.

As variáveis oxigênio dissolvido e pH mantiveram-se dentro da faixa considerada adequada pela OCDE (2012) em ambos os ensaios, superior a 5 mg.L⁻¹ para OD e pH entre 7,5 e 8,2.

Nas Tabelas F-3 e F-4 são apresentados os resultados dos demais parâmetros físico-químicos analisados nos aquários dos ensaios; e nas Tabelas F-5 e F-6, a caracterização da água de cultivo (APÊNDICE F).

5.5.2.1 Reprodução

No decorrer do ensaio com o esgoto bruto foi registrada a morte de um peixe macho do aquário 3 (1,25%) e de uma fêmea no aquário 2 (0%). No período de adaptação ocorreram desovas nos aquários 1 (0%), 3 (1,25%), 6 (5%), 7 (20%) e 8 (20%). Durante o período do ensaio, com os peixes já expostos ao esgoto, foi

observado que no aquário 2 (0%) havia apenas um macho. Por esse motivo, esse aquário foi excluído dos cálculos estatísticos em relação à taxa de reprodução.

No ensaio com o esgoto tratado, duas mortes foram registradas: um macho do aquário 3 (1,25%) e uma fêmea do aquário 8 (20%). A morte da fêmea foi causada por manipulação durante a troca da água do aquário. No período de adaptação somente os peixes do aquário 5 (5%) não reproduziram.

Os dados completos de desova são apresentados no APÊNDICE F (Tabelas F-7 e F-8).

No ensaio com o esgoto bruto, somente os peixes expostos à concentração de 1,25% geraram significativamente menos ovos do que o grupo controle (Tabela 11 e Figura 26). Para o ensaio com o esgoto tratado, não houve diferença na desova por fêmea adulta entre o controle e os demais tratamentos.

Tabela 11 – Média diária, desvio padrão e valores máximos e mínimos de ovos por fêmea viva durante os 21 dias de ensaio

Concentração	Esgoto Bruto			Esgoto Tratado		
	Média ± dp	Máximo	Mínimo	Média ± dp	Máximo	Mínimo
0%	19,5 ± 9,34	36,6	0	16,5 ± 44,2	179	0
1,25%	6,73 ± 9,07	28,8	0	17,0 ± 36,4	154	0
5%	27,8 ± 13,8	53,2	1,9	3,34 ± 8,75	34,4	0
20%	13,8 ± 11,8	42,7	0	6,61 ± 17,9	70,7	0

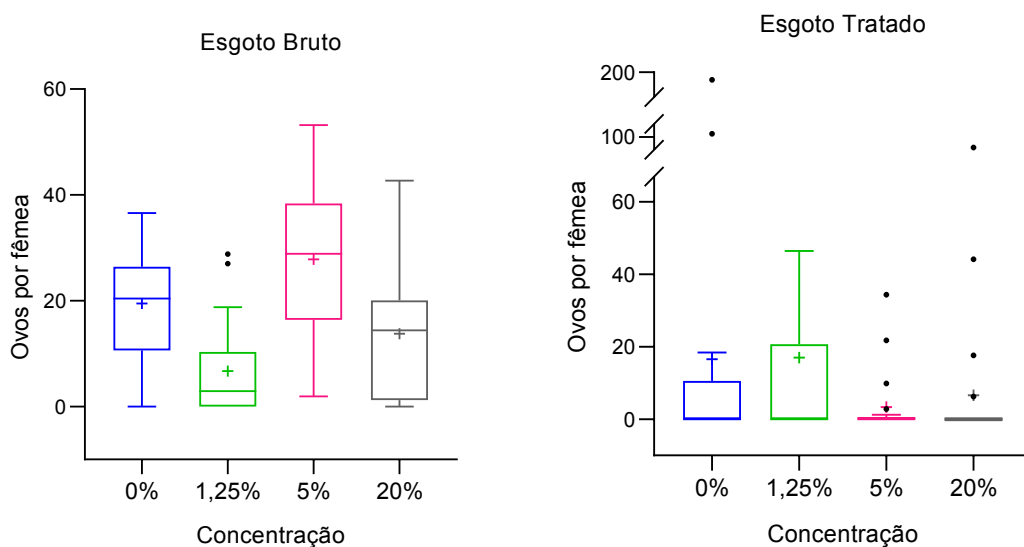


Figura 26 – Diagramas de caixas do número de ovos por fêmea viva nos 21 dias dos ensaios com os esgotos bruto e tratado.

A redução significativa na fecundidade do grupo exposto a 1,25% de esgoto bruto, pode estar relacionada à biodisponibilidade dos contaminantes orgânicos, o que envolve a partição entre a água e os particulados suspensos no sistema (K_{OC}), que se baseia no teor de carbono orgânico. Quanto maior o K_{OC} de um determinado composto orgânico e menor o teor de sólidos totais suspensos, maior será o percentual de contaminante livre dissolvido na água e maior será a toxicidade ao organismo exposto. Com o aumento de particulados no sistema, o contaminante com alto valor de K_{OC} tende a se associar às partículas, o que, no entanto, pode não significar baixa biodisponibilização, uma vez que no trato intestinal de alguns organismos pode conter substâncias que facilitam a liberação desses compostos tóxicos, manifestando assim, a toxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A redução da fecundidade também pode ser atribuída pela alocação de fontes energéticas entre processos fisiológicos. Caso o organismo responda à exposição a um agente tóxico e amplie seu gasto de energia no processo de desintoxicação para garantir sua sobrevivência, esses gastos energéticos adicionais podem ser compensados pela redução da energia dedicada à reprodução (FORBES, 2000).

5.5.2.2 Indução de VTG

Na Figura 27 encontram-se as curvas analíticas utilizadas para cálculo da concentração de VTG nas amostras. No Apêndice F (Tabelas F-9 a F-12) são apresentados os resultados obtidos para cada peixe.

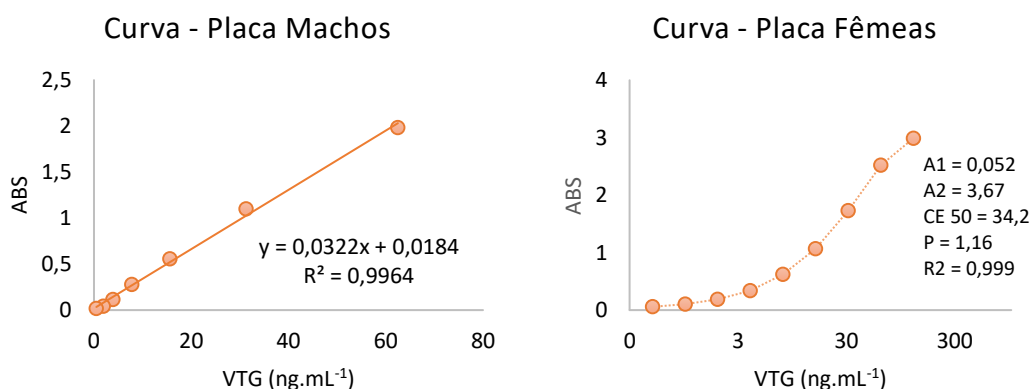


Figura 27 – Curvas-padrão construídas para quantificação de VTG em *D. rerio*.

Conforme orientação do fabricante, cada placa de análise continha uma curva com o padrão de VTG de *D. rerio*. Na placa em que foram analisadas as amostras dos machos, encontrou-se resposta linear entre 0,49 ng.mL⁻¹ e 62,5 ng.mL⁻¹ de VTG. Para a placa das fêmeas, optou-se pela utilização da regressão sigmoidal com o intuito de abranger a maior concentração da curva (0,49 ng.mL⁻¹ a 125 ng.mL⁻¹).

Os testes estatísticos indicaram normalidade e homogeneidade das variâncias para todos os grupos analisados e não identificou diferença significativa do controle com as diluições de esgoto nos dois ensaios, tanto para machos, quanto para fêmeas. As Tabelas 12 e 13 apresentam as médias, desvios-padrão e valores máximos e mínimos da concentração de VTG nos organismos e a Figura 28 mostra os resultados encontrados na forma de diagrama de caixas.

Tabela 12 – Média, desvio padrão e valores máximos e mínimos das concentrações de VTG (ug.g⁻¹) nos organismos machos após 21 dias de exposição às amostras

Concentração	Esgoto Bruto			Esgoto Tratado		
	Média ± dp	Máximo	Mínimo	Média ± dp	Máximo	Mínimo
0%	0,209 ± 0,305	0,714	0,002	0,587 ± 0,301	0,896	0,114
1,25%	1,19 ± 1,84	3,95	0,182	1,99 ± 2,36	5,44	0,447
5%	0,174 ± 0,243	0,507	0,002	2,73 ± 2,10	5,58	0,366
20%	0,188 ± 0,199	0,460	0,003	2,12 ± 2,01	4,62	0,353

Tabela 13 – Média, desvio padrão e valores máximos e mínimos das concentrações de VTG (ug.g⁻¹) nos organismos fêmeas após 21 dias de exposição às amostras

Concentração	Esgoto Bruto			Esgoto Tratado		
	Média ± dp	Máximo	Mínimo	Média ± dp	Máximo	Mínimo
0%	830,1 ± 1.211	2.588	16,07	242,7 ± 212,3	446,6	45,21
1,25%	326,9 ± 473,0	1.024	0,002	3.139 ± 3.673	8.272	468,6
5%	169,5 ± 195,1	436,0	11,31	2.107 ± 1.998	4.107	341,5
20%	202,6 ± 129,0	361,1	46,08	318,9 ± 94,72	443,9	230,4

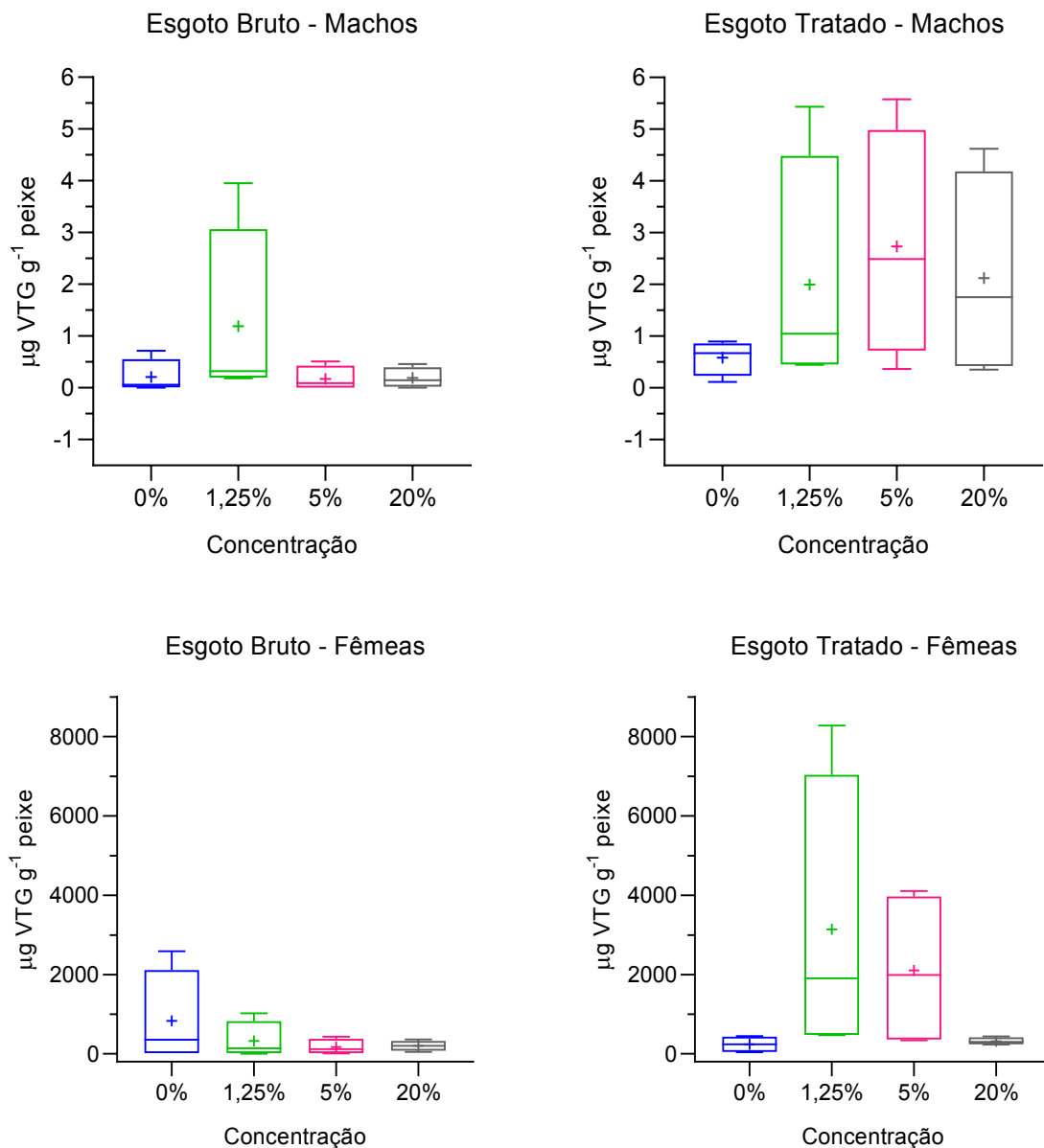


Figura 28 – Diagramas de caixa, organizados por ensaio e sexo, das concentrações de VTG (µg.g⁻¹) encontradas em *D. rerio* nos ensaios de 21 dias.

A indução de VTG nos machos expostos às concentrações de 5% e 20% de esgoto tratado foi significativamente superior se comparada às mesmas concentrações de esgoto bruto. Nas fêmeas, a indução de VTG foi maior nos grupos expostos à 1,25% e 5% do esgoto tratado em comparação com as mesmas concentrações de esgoto bruto. Essa diferença corrobora os resultados das concentrações obtidas no ensaio YES, em que o esgoto tratado apresentou maior estrogenicidade em comparação com o esgoto bruto.

As concentrações de VTG nos machos do controle negativo (água da torneira desclorada) variaram de $0,002 \mu\text{g.g}^{-1}$ a $0,89 \mu\text{g.g}^{-1}$, com médias de $0,21 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $0,59 \mu\text{g.g}^{-1}$ para o primeiro e o segundo ensaio, respectivamente. As concentrações obtidas são superiores aos valores encontrados na literatura ($0,04 \mu\text{g.g}^{-1}$, em exposição de 8 dias em água reconstituída; e $0,12 \mu\text{g.g}^{-1}$, na exposição de 21 dias em água filtrada em carvão ativado) (ROSE *et al.*, 2002; TETA; NAIK, 2017).

A concentração de $11.000 \text{ ng.mL}^{-1}$ nos organismos machos expostos a 5% do esgoto tratado excedeu resultados de exposição a concentrações de 25 ng.L^{-1} de E2 durante 21 dias (5.000 ng.mL^{-1}) (BRION *et al.*, 2004).

A média da concentração de VTG encontrada dos grupos de 5% e 20% na exposição ao esgoto tratado nesta pesquisa foram, respectivamente, de 2,7 e 2,1 μg de VTG por grama de peixe, valores ligeiramente superiores a $1 \mu\text{g VTG g}^{-1}$ peixe registrado em exposição de 8 dias a concentrações de E2 de $21,4 \text{ ng.L}^{-1}$ (ROSE *et al.*, 2002). Em contraste, esses resultados foram muito inferiores aos valores médios registrados em peixes expostos ao efluente municipal sem diluição da cidade de Bulawayo, Zimbábue ($2.000 \mu\text{g.g}^{-1}$) (TETA; NAIK, 2017).

No Brasil, em avaliação da atividade estrogênica das águas do rio Itapecuru em Bacabeira, MA, Verbinenn (2014) encontrou diferenças significativas na concentração de VTG nos machos expostos em 100% das águas do rio, com concentração média aproximada igual a $3 \mu\text{g VTG g}^{-1}$.

As medidas de VTG devem ser consideradas positivas caso ocorra um aumento estatisticamente significativo nos machos ($p\text{-valor} \leq 0,05$) ou uma redução, também significativa, nas fêmeas (OCDE, 2012). Dessa forma, não foi possível evidenciar a desregulação endócrina nos organismos-teste analisados.

6 CONCLUSÃO

O esgoto bruto da cidade de Viçosa analisado foi classificado como extremamente tóxico para o estágio larval do peixe *D. rerio* e para o microcrustáceo *C. dubia*. Para o estágio embriolarval do peixe, a amostra foi classificada como altamente tóxica.

Os parâmetros físico-químicos do esgoto tratado, regulamentados pela legislação do estado de Minas Gerais, apresentaram valores abaixo dos limites máximos de lançamento de efluentes.

O tratamento biológico anaeróbio avaliado não reduziu a toxicidade e o esgoto tratado apresentou a mesma toxicidade do esgoto bruto, evidenciando a necessidade de pós-tratamento.

O ensaio FET de 96 h se mostrou adequado para a avaliação da toxicidade aguda em esgotos sanitários, apresentando boa repetibilidade e sensibilidade similar à do ensaio agudo com peixe adulto.

O ensaio FET de 168 h demonstrou boa repetibilidade e adequabilidade para avaliação da toxicidade crônica de curta duração no estágio embriolarval do peixe-zebra.

O tratamento realizado pelo reator UASB aumentou a atividade estrogênica da amostra, possivelmente pela formação de subprodutos estrogenicamente ativos e desconjugação de compostos complexados.

Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas na indução de VTG nos organismos expostos aos esgotos bruto e tratado em comparação com os organismos controle.

A maior atividade estrogênica no esgoto tratado foi reforçada pela maior indução de VTG nos peixes machos expostos ao esgoto tratado, em comparação com o esgoto bruto.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). **Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas**. Brasília: ANA, 2017. 88 p. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/ATLASESGOTOSDespoluicaoodeBaciasHidrograficas-ResumoExecutivo_livro.pdf> Acesso em 17 jul. 2019.

ANSELMO, C. S.; SARDELA, V. F.; SOUSA, V. P. DE; PEREIRA, H. M. G. Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 212, p. 34–46, 2018.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. **Standard Methods**, 541 p., 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustácea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15499**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2016.

ALVES, R. N.; MARIZ, C. F.; PAULO, D. V. DE; CARVALHO, P. S. M. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 178, p. 224–230, 2017.

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. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, p. 187–204, 2013.

BABIĆ, S.; BARIŠIĆ, J.; VIŠIĆ, H.; SAUERBORN KLOBUČAR, R.; TOPIĆ POPOVIĆ, N.; STRUNJAK-PEROVIĆ, I.; ČOŽ-RAKOVAC, R.; KLOBUČAR, G. Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. **Water Research**, v. 115, p. 9–21, 2017.

BERTOLETTI, E. Determinação da ecotoxicidade crônica para *Danio rerio*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1994, p. 1–7, 2009.

BICKHAM, J. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 463, n. 1, p. 33–51, 2000.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process**. 1ª edição. Ed.: Lewis Publishers, 295 p., 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, Capítulo 1, 13 de maio de 2011, p.89.

BRAUNBECK, T.; BÖTTCHER, M.; HOLLERT, H.; KOSMEHL, T. LAMMER, E.; LEIST, E.; RUDOLF M.; SEITZ, N. Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. **ALTEX Alternatives to Animal Experimentation**, 22(2):87–102, 2005.

BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E.; OTTE, J.; SCHNEIDER, K.; STENGEL, D. STRECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, DOI 10.1007/s11356-014-3814-7, 2014.

BRICIU, R. D.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environments. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 2, p. 127–139, 2009.

BRION, F.; TYLER, C. R.; PALAZZI, X.; LAILLET, B.; PORCHER, J. M.; GARRIC, J.; FLAMMARION, P. Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 3, p. 193–217, 2004.

BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. **Process Biochemistry**. p. 45.47, 1982.

BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; *et al.* OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 496–511, 2014.

CHEN, T. H.; CHOU, S. M.; TANG, C. H.; CHEN, C. Y.; MENG, P. J.; KO, F. C.; CHENG, J. O. Endocrine disrupting effects of domestic wastewater on reproduction, Sexual behavior, And gene expression in the brackish medaka *Oryzias melastigma*. **Chemosphere**, v. 150, p. 566–575, 2016.

CHERNICHARO, C. A. L. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. **Reatores Anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG. 2007. 380p.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL; CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DE MINAS GERAIS. Deliberação Normativa conjunta COPAM / CERH nº 1 de 05 de maio de 2008. 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. Belo Horizonte: **COPAM**, 2008.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

DIN, Deutsches Institut Für Normung. **DIN 38415-6**: Toxicity to fish; determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T 6). 2001.

DÜPONT, A.; LOBO, E. A. Evaluation of the efficiency of the sewage treatment plant from the University of Santa Cruz do Sul (UNISC), RS, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, n. 2, p. 119–126, 2012.

EREMEK TAR, G.; SELCUK, H.; MERIC, S. Investigation of the relation between COD fractions and the toxicity in a textile finishing industry wastewater: Effect of preozonation. **Desalination**, v. 211, n. 1–3, p. 314–320, 2007.

FORBES, V. E. Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology**, v. 14 p. 12–24, 2000.

FROEHNER, S.; PICCIONI, W.; MACHADO, K. S.; AISSE, M. M. Removal capacity of caffeine, hormones, and bisphenol by aerobic and anaerobic sewage treatment. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 216, n. 1–4, p. 463–471, 2011.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006. 211p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249644>>. Acesso em 19 jul. 2019.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, v. 46, n. 18, p. 5813–5833, 2012.

HANEY, J.F. et al. **"An-Image-based Key to the Zooplankton of North America"** version 5.0 released 2013. University of New Hampshire Center for Freshwater Biology Disponível em: <cfb.unh.edu>. Acesso em 19 Jul. 2019.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/vicosa/panorama>>. Acesso em 30 ago. 2019.

JOBLING, S.; CASEY, D.; ROGERS-GRAY, T.; OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; PAWLOWSKI, S.; BAUNBECK, T.; TURNER, A. P.; TYLER, C. R. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 205–220, 2003.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 17, p. 2498–2506, 1998.

JORDÃO, E. D.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 6. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2011. 1050p.

KANDA, R.; CHURCHLEY, J. Removal of endocrine disrupting compounds during conventional wastewater treatment. **Environmental Technology**, v. 29, n. 3, p. 315–323, 2008.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 2007.

LEUSCH, F. D. L.; CHAPMAN, H. F.; HEUVEL, M. R. VAN DEN; TAN, B. L. L.; GOONERATNE, S. R.; TREMBLAY, L. A. Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 3, p. 403–411, 2006.

LIFESPAN BIOSCIENES, Inc. Disponível em: <<https://www.lsbio.com/elisakits/human-antithrombin-iii-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f10410/10410>>. Acesso em 30 ago. 2019.

LISTER, A.; REGAN, C.; ZWOL, J. VAN; KRAAK, G. VAN DER. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. **Aquatic Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 320–329, 2009.

MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO, S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MATTER-MÜLLER, C.; GUJER, W.; GIGER, W. Transfer of volatile substances from water to the atmosphere. **Water Research**, v. 15, n. 11, p. 1271–1279, 1981.

METCALF, E.; EDDY, H, P, I. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5 ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2016. 1980p.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**. v. 340, n. 9–10, p. 403-405, 2017.

OCDE. Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, n. October, p. 40, 2012.

OCDE. Test No. 236: Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, n. July, p. 1–22, 2013.

PEREIRA, I. W.; ANDRADE, E. M. Estudo sobre compostos orgânicos voláteis na estação de tratamento de esgotos de Suzano - SP. **ABES**. 19° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. p. 898–911, 1997.

PLAHUTA, M.; TIŠLER, T.; TOMAN, M. J.; PINTAR, A. 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, 2017.

PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and Ecology**, v. 8, n. 4, p. 275–285, 1994.

QUEIROZ, F. B.; BRANDT, E. M.; AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A.; AFONSO, R.J. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. **Water Science & Technology**, v. 6612, p. 2562–2569, 2012.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 17–23, 2002.

RAPTIS, C. E.; JURASKE, R.; HELLWEG, S. Investigating the relationship between toxicity and organic sum-parameters in kraft mill effluents. **Water Research**, v. 66, p. 180–189, 2014.

ROSE, J.; HOLBECH, H.; LINDHOLST, C.; NØRUM, U.; POVLSEN, A.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 131, n. 4, p. 531–539, 2002.

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.

SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.; VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394–404, 2008.

SEGNER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 187–195, 2009.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; SANTOS, T. P.; SILVA, N. P. C.; SANTOS, A. R.; ANDRADE, A. L. C.; SOUZA, E. H. L. S.; SALES CADENA, M. R.; SÁ, F. B.; SILVA JUNIOR, V. A.; CADENA, P. G. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 214, p. 330–340, 2019.

SMITAL, T.; TERZIC, S.; ZAJA, R.; SENTA, I.; PIVCEVIC, B.; POPOVIC, M.; MIKAC, I.; TOLLEFSEN, K. E.; THOMAS, K. V.; AHEL, M. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 844–851, 2011.

STELZER, J. A. A.; ROSIN, C. K.; BAUER, L. H.; HARTMANN, M.; PULGATI, F. H.; ARENZON, A. Is fish embryo test (FET) according to OECD 236 sensible enough for delivering quality data for effluent risk assessment? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2925–2932, 2018.

SUÁREZ, S.; CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 125–138, 2008.

TETA, C.; NAIK, Y. S. Vitellogenin induction and reduced fecundity in zebrafish exposed to effluents from the City of Bulawayo, Zimbabwe. **Chemosphere**, v. 167, p. 282–290, 2017.

THE CADMUS GROUP. Nutrient control design manual: State of technology review report. **EPA**, n. January, p. 1–104, 2009.

TILTON, S. C.; FORAN, C. M.; BENSON, W. H. Relationship between ethinylestradiol-mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 352–359, 2005.

VERBINNEN, R. T. **Avaliação da atividade estrogênica das águas do rio Itapecuru no município de Bacabeira - MA**. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2014.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2018. 472 p.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2016. 211 p.

WATER SUPPLIES DEPARTMENT. **2014/15 Annual Report**. Combat against climate change: exploit new water resources and foster water conservation culture. Disponível em:

<https://www.wsd.gov.hk/filemanager/common/annual_report/2014_15/en/index.html>. Acesso em 30 ago. 2019.

WU, L.; SHAO, Y.; HU, Z.; GAO, H. Effects of soluble sulfide on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 183–189, 2016.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. 478p.

APÊNDICE A – Informações do reator UASB utilizado na pesquisa

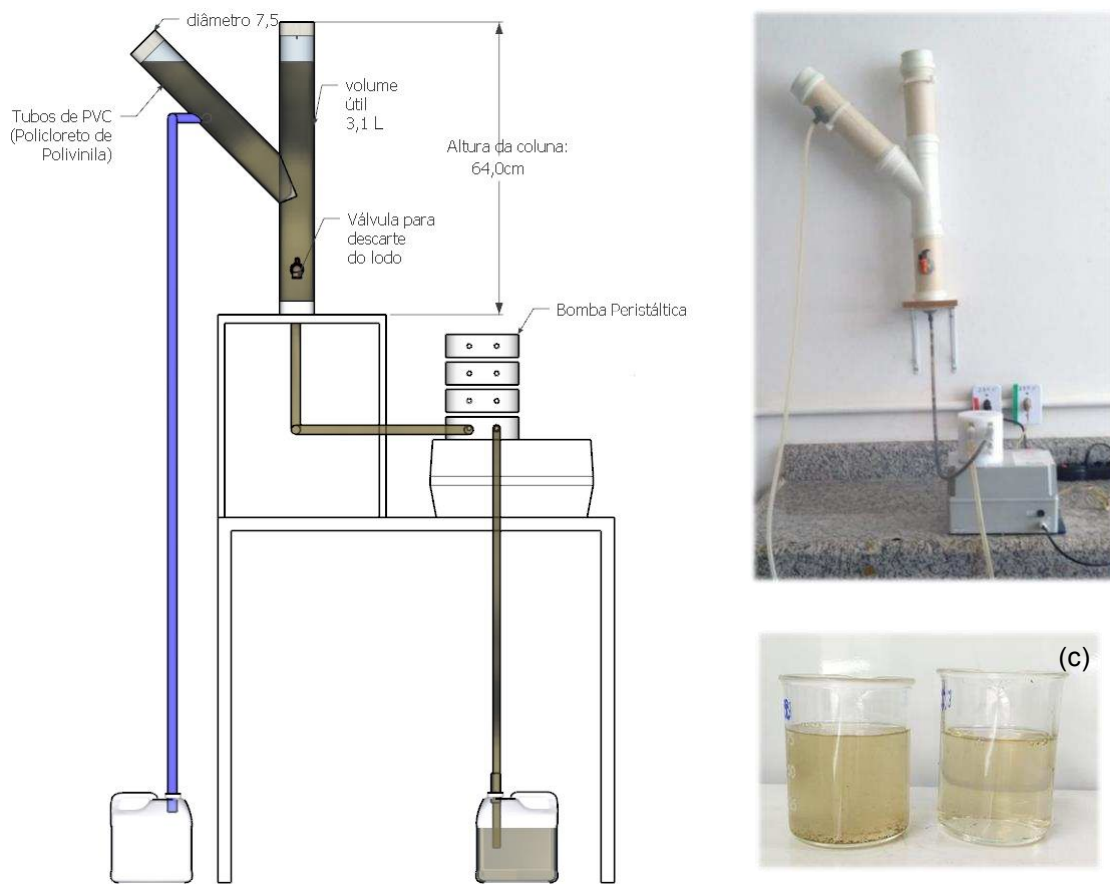


Figura A-1 – (a) Ilustração esquemática do reator anaeróbio de bancada do tipo UASB, (b) reator utilizado na pesquisa e (c) esgotos bruto e tratado, respectivamente

APÊNDICE B – Informações do ensaio agudo com peixe adulto

Tabela B-1 – Peso dos peixes (g)

Peixe	0%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
Macho 1	0,2	0,29	0,23	0,19	0,24	0,29
Macho 2	0,31	0,38	0,59	0,41	0,18	0,27
Macho 3	0,29	0,43	0,30	0,25	0,22	0,21
Macho 4	0,22	0,13	0,19	0,23	0,33	0,26
Macho 5	0,22	0,25	0,35	0,30	0,31	0,34
Média	0,25	0,30	0,33	0,28	0,26	0,27
Fêmea 1	0,38	0,52	0,77	0,62	0,93	0,55
Fêmea 2	0,58	0,55	0,51	0,61	0,52	0,45
Fêmea 3	0,68	0,36	0,72	0,55	0,38	0,57
Fêmea 4	0,47	0,75	0,51	0,49	0,42	0,51
Fêmea 5	0,41	0,43	0,40	0,29	0,59	0,51
Média	0,50	0,52	0,58	0,51	0,57	0,52

Tabela B-2 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais das águas dos aquários

Parâmetro	0%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
OD inicial (mg.L⁻¹)	7,32	7,19	7,25	6,83	5,4	4,62
OD final (mg.L⁻¹)	6,76	6,25	5,95	3,82	6,34	6,39
pH inicial	7,7	7,9	8,1	8	7,9	8
pH final	7,5	7,8	7,9	7,9	8,6	8,8
T inicial (°C)	23,6	23,8	25,6	24,3	24,5	24,9
T final (°C)	25,1	25	25,1	25,3	26,3	25,8
CE inicial (µs.com⁻¹)	92,5	157	224	354	622	1025
CE final (µs.com⁻¹)	98	156	220	344	596	1035

APÊNDICE C – Comparação do desenvolvimento dos organismos no ensaio FET nas duas amostras

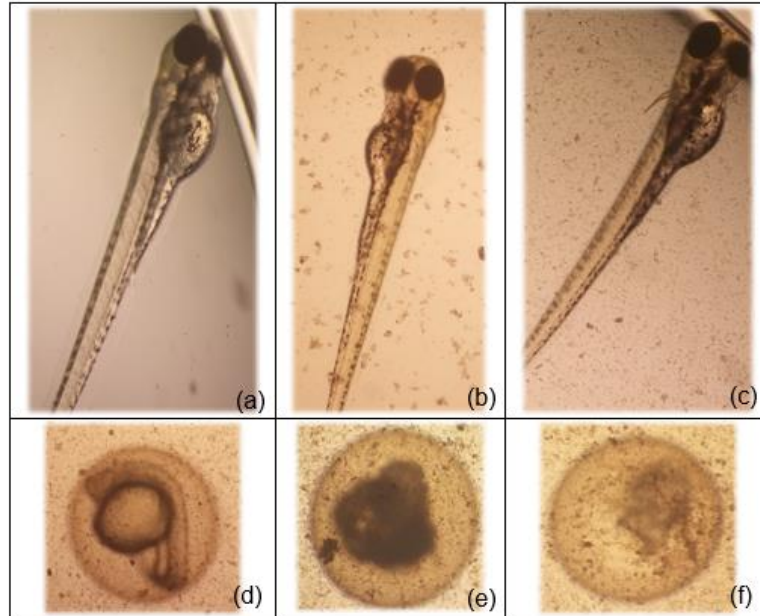


Figura C-1 – Desenvolvimento do embrião no ensaio FET com esgoto bruto a 96 h. (a) controle negativo, (b) 6,25%, (c) 12,5%, (d) 25%, (e) 50% e (f) 100%.

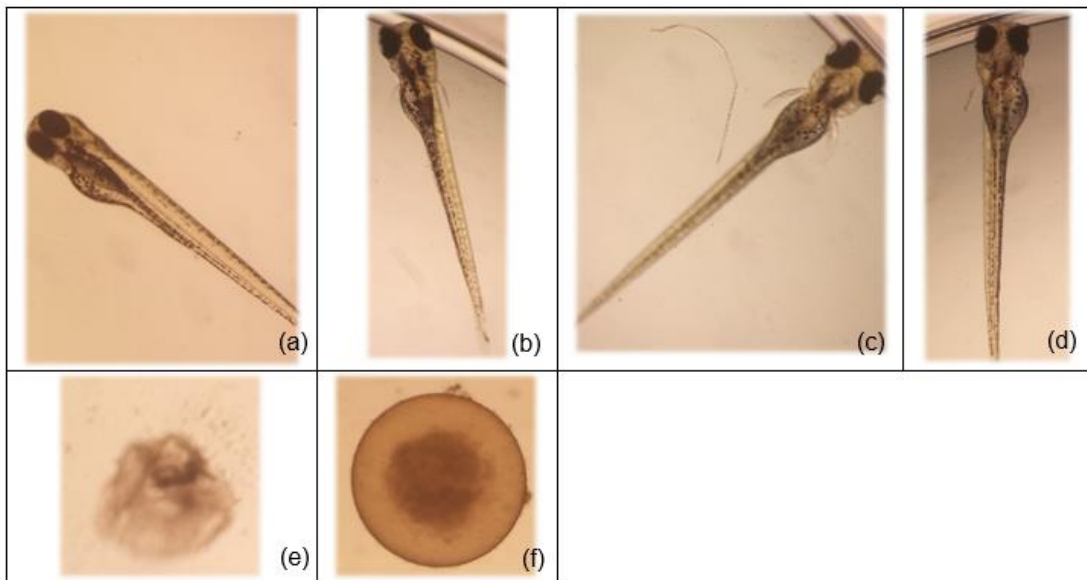


Figura C-2 – Desenvolvimento do embrião no ensaio FET com esgoto tratado a 96 h. (a) controle negativo, (b) 6,25%, (c) 12,5%, (d) 25%, (e) 50% e (f) 100%.

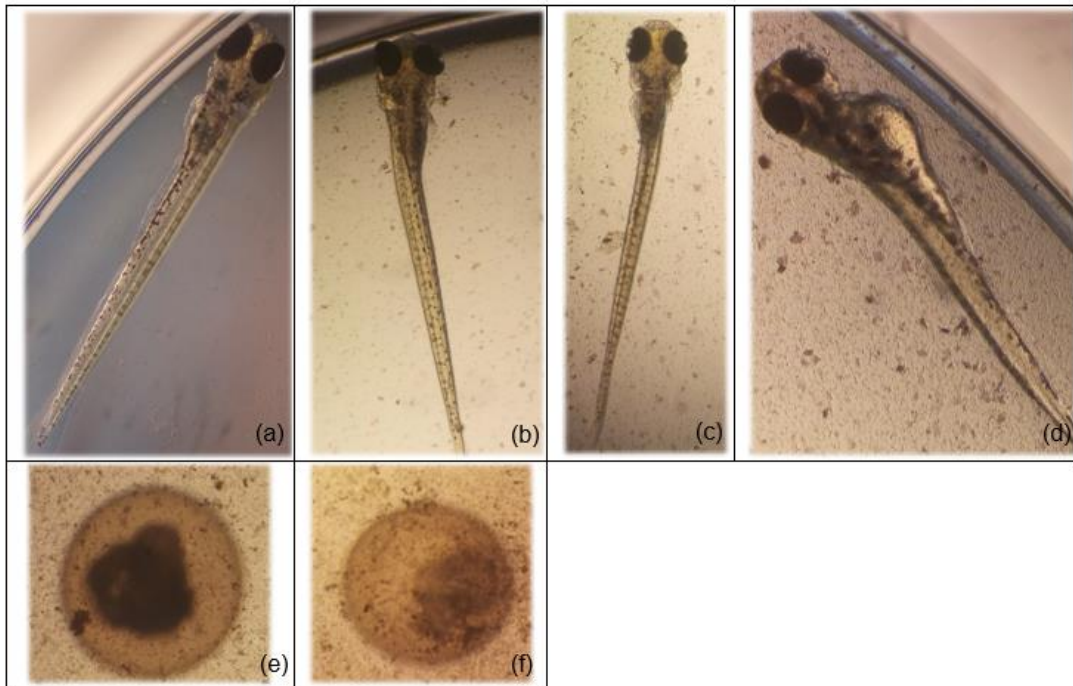


Figura C-3 – Desenvolvimento do embrião no ensaio FET com esgoto bruto a 168 h. (a) controle negativo, (b) 6,25%, (c) 12,5%, (d) 25%, (e) 50% e (f) 100%.

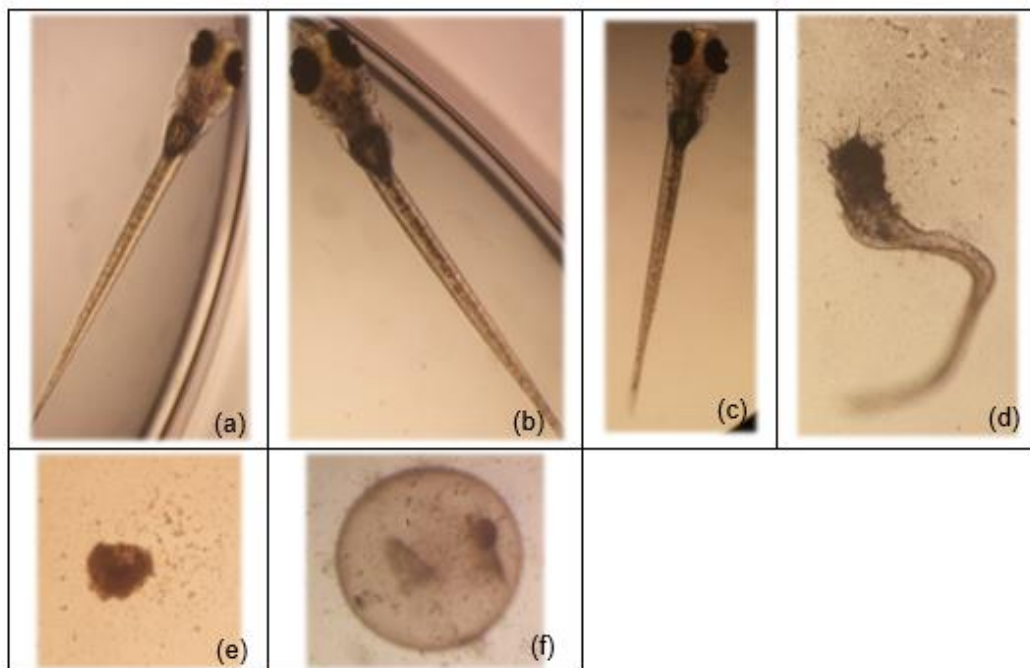


Figura C-4 – Desenvolvimento do embrião no ensaio FET com esgoto tratado a 168h. (a) controle negativo, (b) 6,25%, (c) 12,5%, (d) 25%, (e) 50% e (f) 100%.

APÊNDICE D – Desenvolvimento diário dos organismos no ensaio FET no esgoto bruto

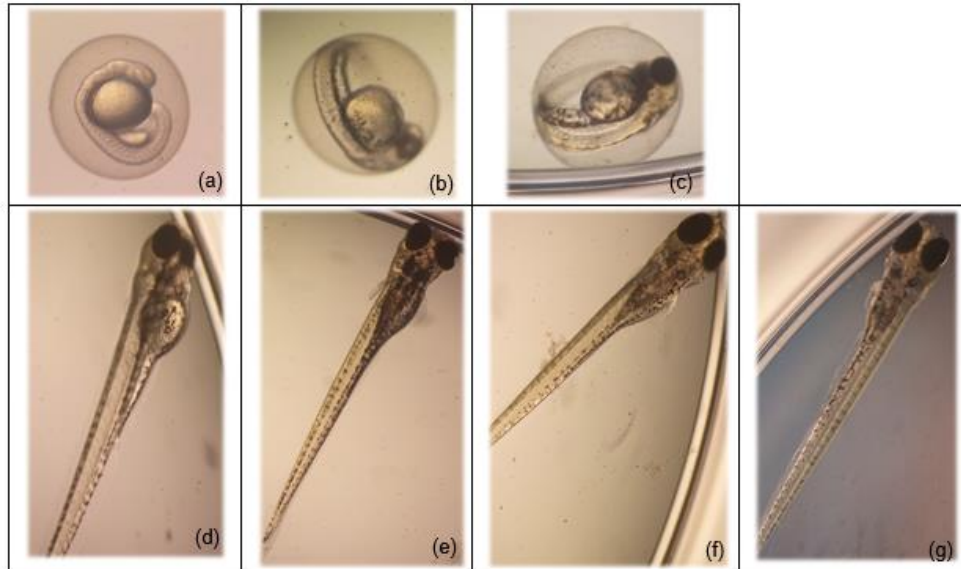


Figura D-1 – Desenvolvimento do embrião no controle negativo. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

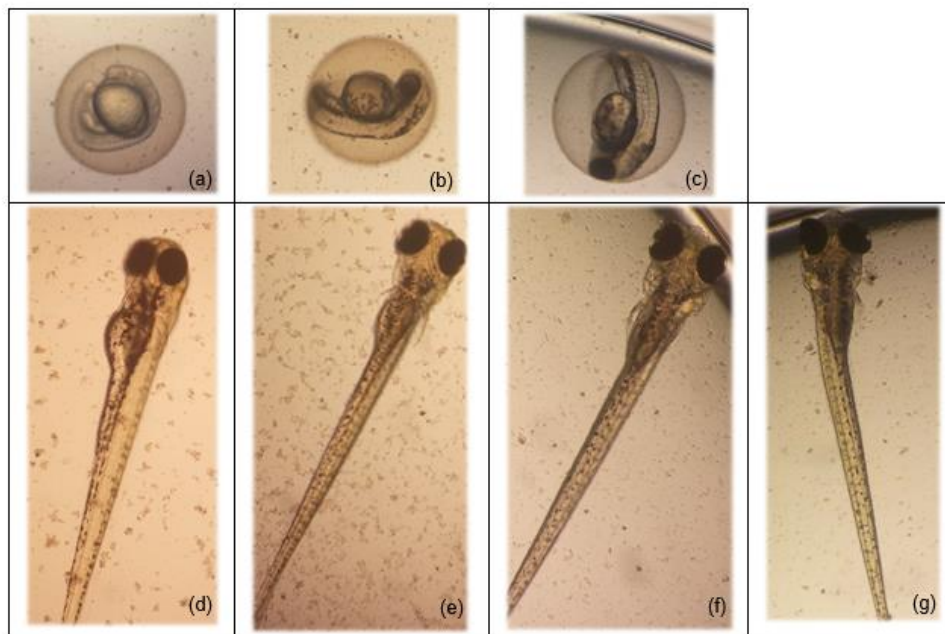


Figura D-2 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 6,25%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

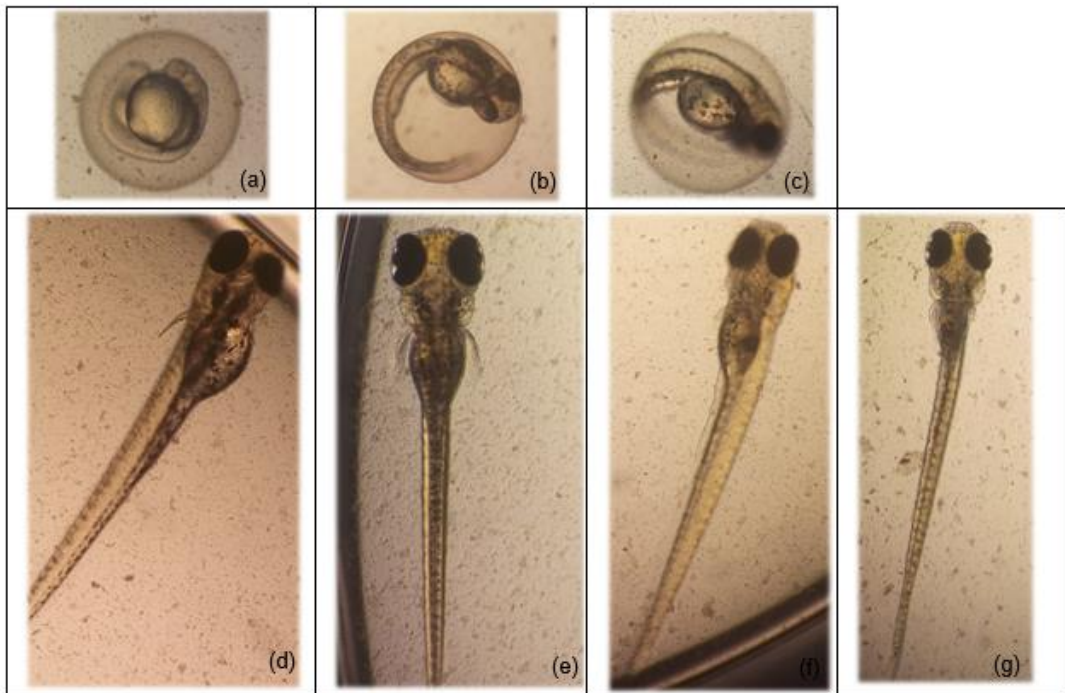


Figura D-3 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 12,5%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

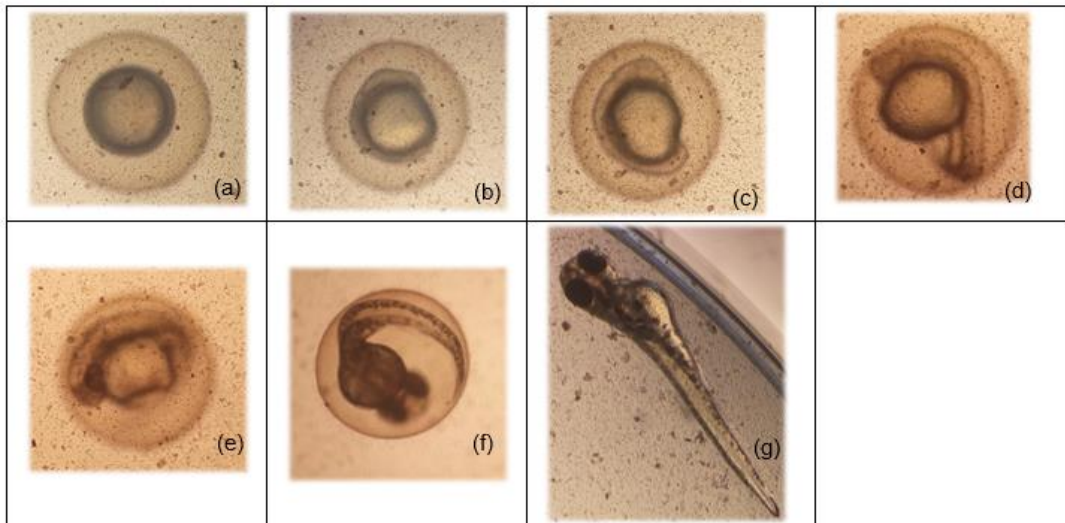


Figura D-4 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 25%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

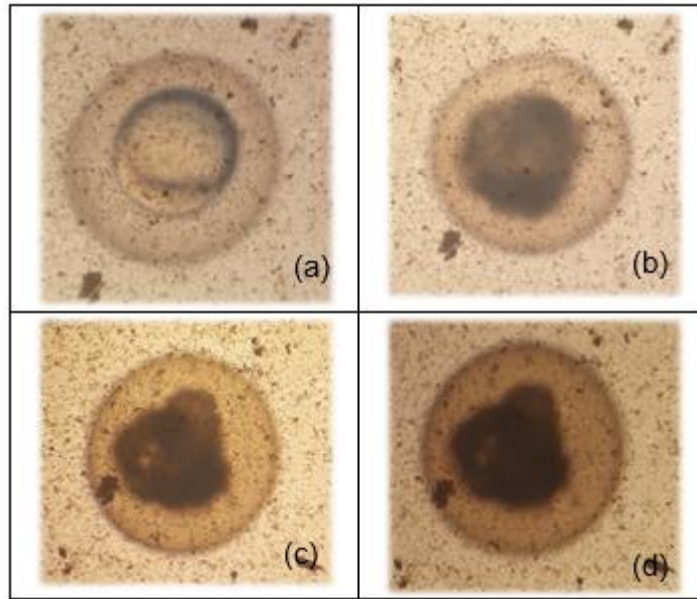


Figura D-5 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 50%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 168 h.

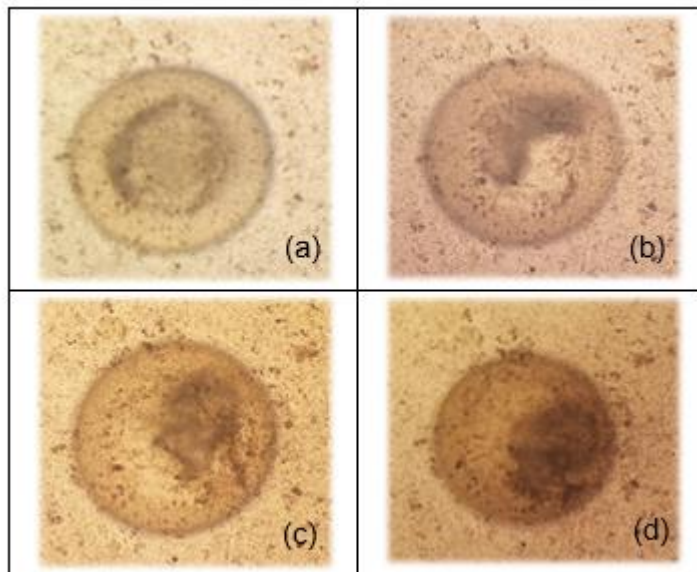


Figura D-6 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 100%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 168 h.

APÊNDICE E – Desenvolvimento diário dos organismos no ensaio FET no esgoto tratado

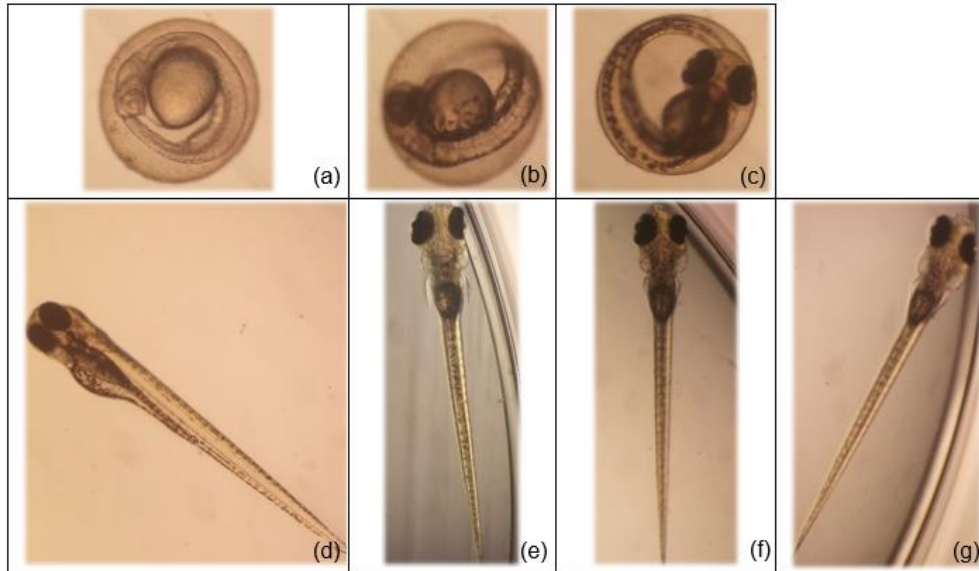


Figura E-1 – Desenvolvimento do embrião no controle negativo. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

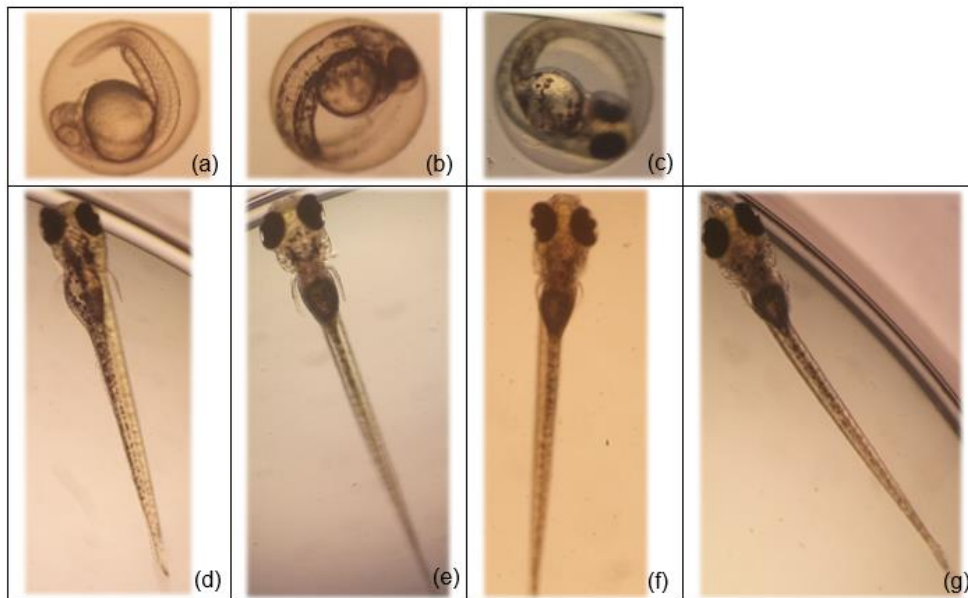


Figura E-2 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 6,25%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

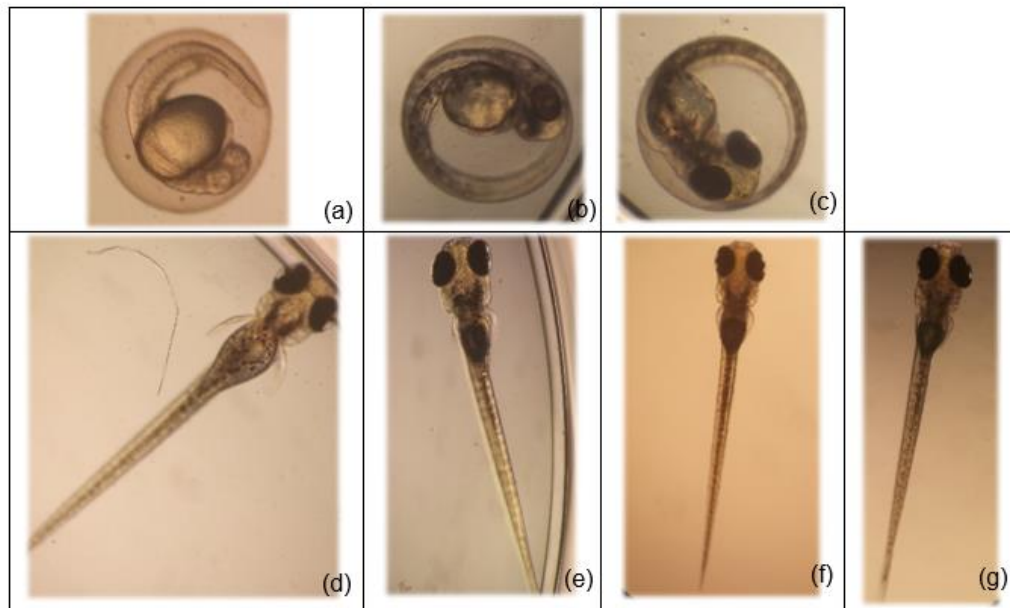


Figura E-3 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 12,5%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

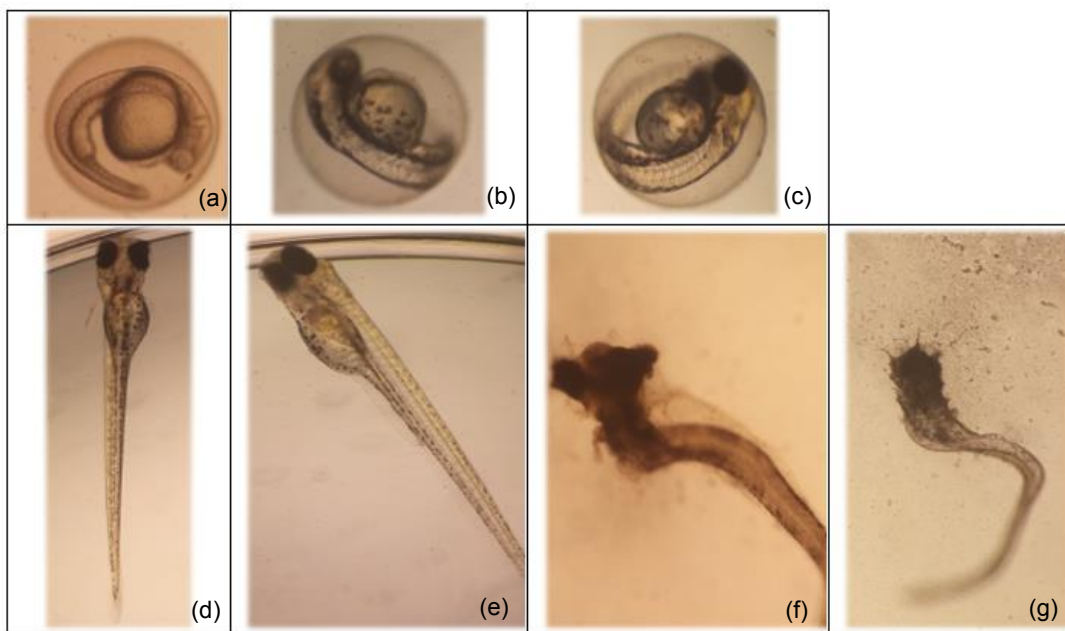


Figura E-4 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 25%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

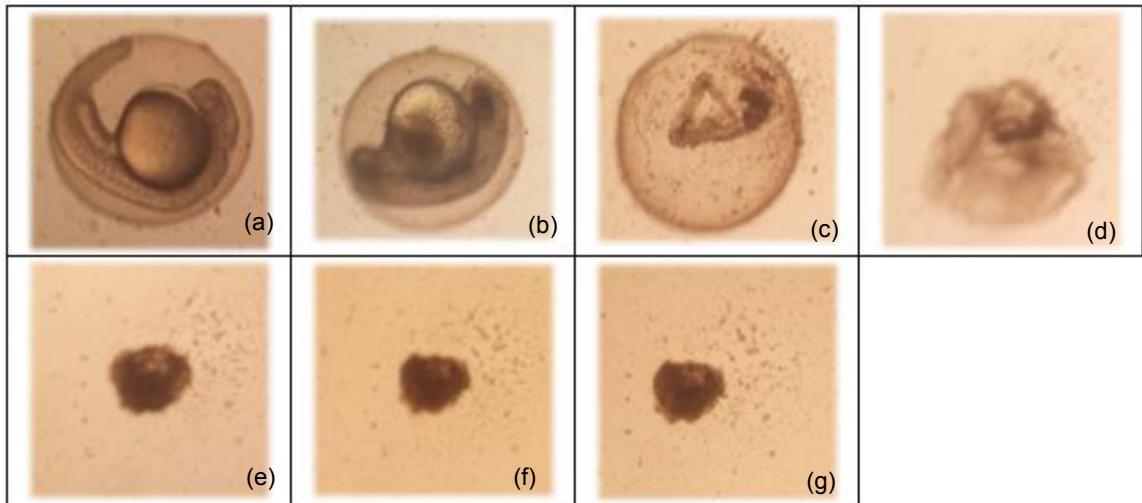


Figura E-5 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 50%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

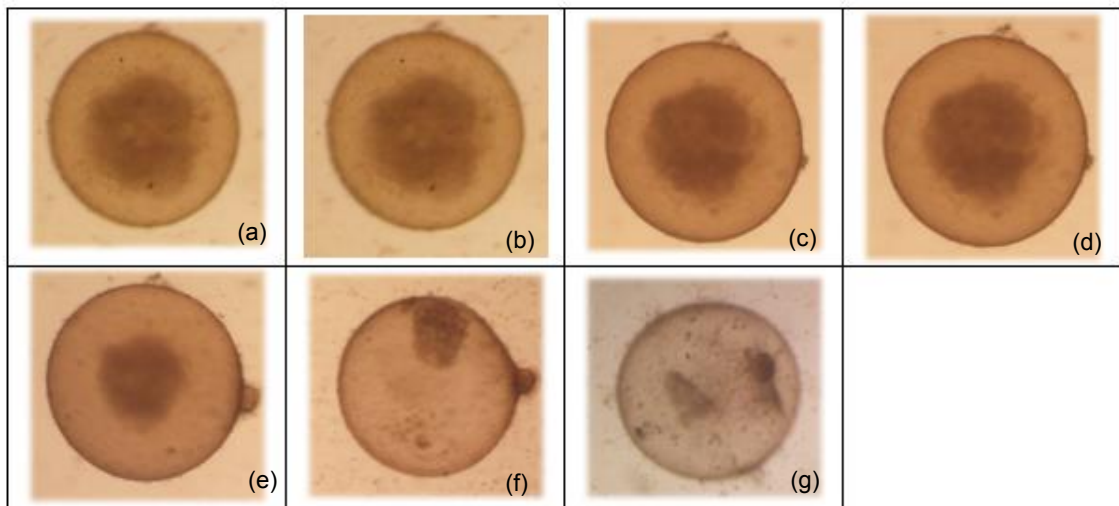


Figura E-6 – Desenvolvimento do embrião na concentração de 100%. (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, (e) 120 h, (f) 144 h e (g) 168 h.

APÊNDICE F – Resultados do ensaio de indução de VTG

Tabela F-1 – Parâmetros físico-químicos dos aquários no ensaio com o esgoto bruto (n = 4)

Aquário	OD (mg.L⁻¹) ± dp	CE (µs.cm⁻¹) ± dp	pH ± dp	T (°C) ± dp
1 (0%)	6,09 ± 0,55	101 ± 3,41	7,35 ± 0,17	25,5 ± 0,7
2 (0%)	6,11 ± 0,07	102 ± 2,30	7,38 ± 0,15	25,9 ± 1,0
3 (1,25%)	5,99 ± 0,51	109 ± 2,90	7,43 ± 0,13	26,3 ± 1,1
4 (1,25%)	5,57 ± 0,82	109 ± 2,51	7,35 ± 0,26	25,7 ± 0,8
5 (5%)	5,58 ± 0,47	141 ± 2,81	7,45 ± 0,17	25,8 ± 0,8
6 (5%)	5,48 ± 0,78	139 ± 4,48	7,38 ± 0,29	26,6 ± 1,1
7 (20%)	5,32 ± 0,41	262 ± 9,26	7,65 ± 0,13	25,8 ± 0,8
8 (20%)	5,98 ± 0,18	264 ± 9,68	7,78 ± 0,05	25,7 ± 1,5

Tabela F-2 – Parâmetros físico-químicos dos aquários no ensaio com o esgoto tratado (n = 4)

Aquário	OD (mg.L⁻¹) ± dp	CE (µs.cm⁻¹) ± dp	pH ± dp	T (°C) ± dp
1 (0%)	6,06 ± 0,15	108 ± 6,12	7,53 ± 0,05	24,8 ± 0,6
2 (0%)	6,23 ± 0,14	104 ± 4,65	7,55 ± 0,06	24,6 ± 0,7
3 (1,25%)	6,17 ± 0,07	115 ± 8,32	7,63 ± 0,10	24,8 ± 0,4
4 (1,25%)	5,93 ± 0,25	115 ± 8,83	7,60 ± 0,08	24,8 ± 0,6
5 (5%)	6,01 ± 0,25	161 ± 6,71	7,78 ± 0,19	25,1 ± 0,3
6 (5%)	5,78 ± 0,23	156 ± 1,97	7,68 ± 0,15	24,9 ± 0,4
7 (20%)	6,26 ± 0,31	309 ± 7,37	7,98 ± 0,33	25,1 ± 0,3
8 (20%)	5,87 ± 0,40	272 ± 58,77	7,90 ± 0,26	24,9 ± 0,5

Tabela F-3 – Resultados de alcalinidade e dureza no ensaio com o esgoto bruto

Concentração (%)	Alcalinidade (mg.L⁻¹ CaCO₃)	Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃)
0	33,9	34,0
1,25	34,0	34,0
5	73,26	42,5
20	74,45	47,6

Tabela F-4 – Resultados de alcalinidade, dureza e N-NH₃ no ensaio com o esgoto tratado

Concentração (%)	Alcalinidade (mg.L⁻¹ CaCO₃) ± dp	Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃) ± dp	N-NH₃ (mg.L⁻¹)
0	40,2 ± 3,08	35,6 ± 5,6	ND
1,25	44,7 ± 2,52	36,6 ± 4,2	ND
5	59,1 ± 6,58	38,6 ± 4,2	ND
20	102,2 ± 7,0	35,6 ± 5,6	14,28

Tabela F-5 – Parâmetros físico-químicos da água de cultivo no ensaio com o esgoto bruto

Parâmetro	Resultado
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	24,92
Dureza (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	30,6
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	ND
COT (mg.L ⁻¹)	2,955
CT (mg.L ⁻¹)	9,121
Cl (mg.L ⁻¹)	6,166
Cloro residual	ND
pH	7,5
CE (µs.cm ⁻¹)	92,7

Tabela F-6 – Parâmetros físico-químicos da água de cultivo no ensaio com o esgoto tratado

Parâmetro	Resultado
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	27
Dureza (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	34
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	ND
COT (mg.L ⁻¹)	2,57
CT (mg.L ⁻¹)	8,47
Cl (mg.L ⁻¹)	5,9

Tabela F-7 – Número de ovos registrado diariamente no ensaio com esgoto bruto

Data	0%	0%	1,25%	1,25%	5%	5%	20%	20%
21/11/2018	0	0	0	0	0	0	0	0
22/11/2018	0	0	0	0	0	0	0	0
23/11/2018	0	0	0	0	0	0	0	0
24/11/2018	50	0	0	0	50	0	50	50
25/11/2018	50	50	0	0	50	0	0	0
26/11/2018	0	0	0	0	0	0	0	0
27/11/2018	0	10	79	0	0	19	64	0
28/11/2018	0	0	19	0	0	117	0	0
29/11/2018	0	25	0	0	0	19	0	0
30/11/2018	101	0	77	0	179	129	0	0
01/12/2018	91	8	20	0	49	50	0	0
02/12/2018	111	0	0	0	106	219	0	0
03/12/2018	123	0	0	0	95	197	0	0
04/12/2018	115	11	54	0	123	0	52	0
05/12/2018	45	16	0	0	113	78	25	0
06/12/2018	102	0	0	0	245	287	85	0
07/12/2018	47	0	0	0	166	123	144	0
08/12/2018	96	0	0	0	69	63	305	50
09/12/2018	143	305	0	0	256	266	114	58
10/12/2018	118	0	0	29	239	0	173	0
11/12/2018	33	0	107	163	163	80	171	65
12/12/2018	141	82	0	37	282	110	76	59
13/12/2018	30	0	0	33	238	138	118	106
14/12/2018	158	0	231	57	79	58	130	0
15/12/2018	59	0	0	29	381	66	59	118
16/12/2018	107	0	0	88	109	127	86	64
17/12/2018	142	0	178	4	343	75	347	80
18/12/2018	183	0	188	0	119	197	89	84
19/12/2018	102	0	0	119	108	96	182	54
Somatório	2047	447	855	559	3462	2378	2156	738
Média	97	21	41	27	165	113	103	35
D.P.	46,7	67,6	72,9	45,3	99,1	80,7	95,9	40,8

Tabela F-8 – Número de ovos registrado diariamente no ensaio com esgoto tratado

Data	0%	0%	1,25%	1,25%	5%	5%	20%	20%
24/01/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
25/01/2019	0	0	5	0	0	0	0	0
26/01/2019	0	0	537	0	0	13	0	407
27/01/2019	180	911	199	0	0	44	0	241
28/01/2019	0	0	0	0	0	0	0	109
29/01/2019	0	0	0	36	0	0	0	0
30/01/2019	550	154	168	2	0	68	19	0
31/01/2019	4	108	217	151	0	0	0	67
01/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
02/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
03/02/2019	0	55	175	0	0	0	0	0
04/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
05/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
06/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
07/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
08/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
09/02/2019	0	0	240	0	0	0	0	0
10/02/2019	0	0	0	0	0	12	0	0
11/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
12/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
13/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
14/02/2019	753	1037	1539	0	0	0	0	0
15/02/2019	442	651	524	102	0	344	0	0
16/02/2019	184	0	58	406	0	218	0	50
17/02/2019	75	0	0	0	0	99	222	344
18/02/2019	56	87	99	0	0	0	141	0
19/02/2019	0	136	314	118	0	28	186	167
20/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
21/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0
Somatório	1510	1966	2949	626	0	701	549	561
Média	72	94	140	30	0	33	26	27
D.P.	187	259	348	92	0	88	67	82

Tabela F-9 – Concentrações de VTG nos organismos machos no ensaio com o esgoto bruto

Tratamento	Aquário	Amostra	Diluição	Peso (g)	VTG (µg/mL)	VTG (µg/g)	Média (µg/g)
0%	1	M4	500	0,4034	2,88	0,7137	0,2081
	1	M1	500	0,4784	0,37	0,0782	
	2	M1	500	0,2799	0,11	0,0405	
	2	M1	500	0,2799	0,00	0,0020	
1,25%	3	M2	500	0,3918	1,59	0,4064	1,3394
	3	M1	500	0,4515	1,05	0,2321	
	4	M2	500	0,4706	27,1	3,9537	
	4	M3	500	0,4614	0,84	0,1822	
5%	5	M1	500	0,4592	0,84	0,1840	0,1728
	5	M5	500	0,4095	2,08	0,5074	
	6	M2	500	0,3886	0,00	0,0020	
	6	M1	500	0,4177	0,00	0,0020	
20%	7	M2	500	0,3133	1,44	0,4597	0,1884
	7	M1	500	0,5107	1,07	0,2090	
	8	M5	500	0,4111	0,34	0,0822	
	8	M4	500	0,4076	0,01	0,0029	

Tabela F-10 – Concentrações de VTG nos organismos machos no ensaio com o esgoto tratado

Tratamento	Aquário	Amostra	Diluição	Peso (g)	VTG (µg/mL)	VTG (µg/g)	Média (µg/g)
0%	1	M4	500	0,4901	0,56	0,1136	0,6281
	1	M1	500	0,4576	5,23	0,7537	
	2	M4	500	0,4432	3,97	0,8955	
	2	M2	500	0,4922	2,88	0,5843	
1,25%	3	M3	500	0,4522	2,02	0,4471	1,9947
	3	M4	500	0,3481	1,61	0,4626	
	4	M4	500	0,4775	26,0	5,4372	
	4	M2	500	0,4775	7,79	1,6320	
5%	5	M3	500	0,5132	1,34	1,7784	2,7318
	5	M1	500	0,5132	1,88	0,3663	
	6	M1	500	0,4817	15,4	3,2034	
	6	M3	500	0,4783	26,7	5,5791	
20%	7	M5	500	0,4311	19,9	4,6202	2,1209
	7	M1	500	0,521	3,28	0,6304	
	8	M4	500	0,4813	1,70	0,3526	
	8	M2	500	0,4589	13,2	2,8806	

Tabela F-11 – Concentrações de VTG nos organismos fêmeas no ensaio com o esgoto bruto

Tratamento	Aquário	Amostra	Diluição	Peso (g)	VTG (µg/mL)	VTG (µg/g)	Média (µg/g)
0%	1	F1	30000	0,6460	263,38	40,771	830,16
	1	F2	30000	0,6113	98,240	16,070	
	2	F5	1800000	0,4964	1.2848	2588,2	
	2	F1	30000	0,5354	3616,8	675,54	
1,25%	3	F3	1800000	0,6492	6650,3	1024,4	326,99
	3	F2	30000	0,6715	-	0,0020	
	4	F5	30000	0,3675	773,90	210,58	
	4	F4	30000	0,7463	544,74	72,991	
5%	5	F1	30000	0,4470	50,540	11,306	169,46
	5	F2	30000	0,6052	1171,6	193,59	
	6	F1	30000	0,5356	198,06	36,978	
	6	F3	30000	0,5185	2260,5	435,97	
20%	7	F1	30000	0,4413	1593,3	361,06	202,60
	7	F4	30000	0,8428	388,34	46,077	
	8	F4	30000	0,5393	1018,1	188,79	
	8	F4	30000	0,5393	1156,6	214,46	

Tabela F-12 – Concentrações de VTG nos organismos fêmeas no ensaio com o esgoto tratado

Tratamento	Aquário	Amostra	Diluição	Peso (g)	VTG (µg/mL)	VTG (µg/g)	Média (µg/g)
0%	1	F4	30000	0,8907	660,48	74,153	242,6
	1	F5	30000	0,8936	3616,9	404,75	
	2	F3	30000	0,7924	358,29	45,215	
	2	F4	30000	0,8099	3616,9	446,58	
1,25%	3	F4	1800000	0,6657	55069	8272,3	3138,9
	3	F5	30000	0,7719	3616,9	468,57	
	4	F2	1800000	0,7923	26258	3314,1	
	4	F4	30000	0,6955	3480,4	500,43	
5%	5	F1	1800000	1,057	37461	3543,7	2106,7
	5	F5	30000	1,059	3616,9	341,51	
	6	F5	1800000	0,8540	35076	4107,3	
	6	F2	30000	0,8325	3616,9	434,46	
20%	7	F2	30000	0,8740	2013,7	230,40	318,8
	7	F1	30000	0,8340	2196,1	263,32	
	8	F3	30000	0,8547	2886,9	337,76	
	8	F1	30000	0,8147	3616,9	443,95	

**ANEXO A – Certificado de aprovação da CEUA/UFV para o desenvolvimento da
pesquisa com peixes**

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 08/2018, intitulado **“Avaliação ecotoxicológica do esgoto sanitário tratado por processo biológico anaeróbio”**, coordenado pela professora Ann do Departamento de Engenharia Civil, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 26/04/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 08/2018, named **“Ecotoxicological evaluation of sanitary sewage treated by anaerobic biological processes”**, is in agreement with the an actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on April 26, 2018 valid for 12 months.


Prof. Átima Clemente Alves Zuanon
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO B – Tratamento estatístico do ensaio preliminar

Para verificar diferenças estatísticas significativas entre os ensaios preliminares com as amostras com e sem filtração foi utilizado o tratamento estatístico apresentado na Equação 6 (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Essas equações consideram o intervalo de confiança superior e os índices de CE₅₀ ou CL₅₀ dos ensaios que se deseja comparar.

Primeiramente, calcula-se o índice estatístico G:

$$G = \sqrt{\left(\log\left(\frac{UL_{(1)}}{CE_{50(1)}}\right)\right)^2 + \left(\log\left(\frac{UL_{(2)}}{CE_{50(2)}}\right)\right)^2} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

UL₍₁₎ = intervalo de confiança superior para o teste 1;

UL₍₂₎ = intervalo de confiança superior para o teste 2;

CE₅₀₍₁₎ = concentração efetiva para o teste 1;

CE₅₀₍₂₎ = concentração efetiva para o teste 2.

Em seguida, aplicam-se as seguintes fórmulas:

$$H = 10^G$$

$$Z = \frac{\text{CE50 maior}}{\text{CE50 menor}}$$

Se $Z > H$, há diferença significativa entre os valores de CE₅₀ ou CL₅₀.

ANEXO C – Cálculo da concentração de amônia livre

A concentração da amônia livre na água, pode ser calculada pela Equação 7:

$$NH_3, \% = \frac{[NH_3] \times 100}{[NH_3] + [NH_4^+]} = \frac{100}{1 + [NH_4^+]/[NH_3]} = \frac{100}{1 + [H^+]/K_a} \quad \text{Equação 7}$$

K_a = constante de ionização (dissociação) a 25°C = $10^{-9,25}$ ou $5,62 \times 10^{-10}$